

**Wirkstoffträgersysteme basierend  
auf bolaamphiphilen Lipiden zur topischen  
photodynamischen Therapie von Infektionen**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der  
Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Nathalie A. Goergen**

aus **Bad Honnef**

Marburg/Lahn 2020





Erstgutachter: Prof. Dr. Udo Bakowsky

Zweitgutachter: Prof. Dr. Frank Runkel

Eingereicht am: 09.10.2020

Tag der mündlichen Prüfung am: 24.11.2020

Hochschulkennziffer: 1180

Die vorliegende Arbeit entstand  
auf Anregung und unter der Leitung von

Prof. Dr. Udo Bakowsky

Am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie  
der Philipps-Universität Marburg

**Meiner Familie, in Liebe und Dankbarkeit**

**Ma famille, avec amour et gratitude**

*„Es wird ja fleißig gearbeitet und viel mikroskopiert, aber es müsste mal wieder einer einen gescheiten Gedanken haben“*

(Rudolf Virchow)

# Inhalt

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Infektionen der Haut- und Schleimhaut – ein unterschätztes Risiko?.....</b>	<b>1</b>
1.1.1.	Die Rolle von Bakterien bei lokalen Infektionen .....	1
1.1.2.	Die Rolle von Pilzen bei lokalen Infektionen .....	5
<b>1.2.</b>	<b>Grundlagen der Photodynamische Therapie.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.</b>	<b>Methylenblau als Photosensitizer .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4.</b>	<b>Antimikrobielle Photodynamische Therapie – aPDT .....</b>	<b>13</b>
1.4.1.	aPDT und Bakterien.....	13
1.4.1.1.	Wirkung der aPDT auf Bakterien .....	14
1.4.2.	aPDT und Hefen.....	16
1.4.2.1.	Wirkung der aPDT auf Hefen.....	16
<b>1.5.</b>	<b>Bolaamphiphile .....</b>	<b>18</b>
1.5.1.	Natürliche Bolaamphiphile – Tetraetherlipide .....	19
1.5.1.1.	Tetraetherlipide als Wirkstoffträgersysteme .....	21
1.5.1.2.	Wirkstoffträgersysteme aus herkömmlichen Phospholipiden .....	22
1.5.1.3.	Vesikuläre Phospholipid Gele – VPGs .....	24
1.5.2.	Synthetische Bolaamphiphile .....	25
1.5.2.1.	Synthetische Bolaamphiphile als Wirkstoffträgersysteme .....	26
<b>1.6.</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>28</b>
<b>2.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1.</b>	<b>Herstellung der Wirkstoffträgersysteme aus natürlichen Bolaamphiphilen .....</b>	<b>30</b>
2.1.1.	Gewinnung der Tetraetherlipide aus <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> .....	30
2.1.2.	Herstellung der vesikulären Phospholipid Gele aus Tetraether- und Phospholipiden.....	31
<b>2.2.</b>	<b>Herstellung der Wirkstoffträgersysteme aus synthetischen Bolaamphiphilen.....</b>	<b>33</b>
2.2.1.	Hydrogele .....	33
2.2.2.	Aerogelee .....	33

<b>2.3.</b>	<b>Herstellung von Hydrogelen aus Hydroxyethylcellulose 300 .....</b>	<b>35</b>
<b>2.4.</b>	<b>Physikalische Charakterisierung der Wirkstoffträgersysteme .....</b>	<b>35</b>
2.4.1.	Rotationsviskosimeter .....	35
2.4.2.	Rasterelektronenmikroskopie .....	36
2.4.3.	Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie der vesikulären Phospholipid Gele aus Tetraether- und Phospholipiden .....	37
<b>2.5.</b>	<b>Untersuchung der Freisetzung von Methylenblau aus den Wirkstoffträgersystemen .....</b>	<b>37</b>
<b>2.6.</b>	<b><i>In vitro</i> Untersuchung der aPDT gegen Bakterien .....</b>	<b>39</b>
2.6.1.	Kultivierung von <i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> .....	39
2.6.2.	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	40
2.6.3.	aPDT gegen <i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> & <i>Escherichia coli</i> .....	40
2.6.4.	aPDT gegen <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> .....	41
<b>2.7.</b>	<b><i>In vitro</i> Untersuchung der aPDT gegen Hefen .....</b>	<b>42</b>
<b>2.8.</b>	<b><i>Ex vivo</i> Untersuchung der Hämokompatibilität .....</b>	<b>43</b>
<b>2.9.</b>	<b>Untersuchung der Verträglichkeit <i>in ovo</i> .....</b>	<b>44</b>
2.9.1.	Kultivierung der Hühnerembryonen .....	45
2.9.2.	Schleimhautverträglichkeit der Wirkstoffträgersysteme .....	45
2.9.3.	Langzeitverträglichkeit der Aerogele .....	47
2.9.4.	Verträglichkeit der photodynamischen Therapie.....	47
<b>3.</b>	<b>Herstellung und Charakterisierung der Wirkstoffträgersysteme – Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1.</b>	<b>Wirkstoffträgersysteme aus natürlichen Bolaamphiphilen .....</b>	<b>49</b>
3.1.1.	Gewinnung der Tetraetherlipide aus <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> .....	49
3.1.2.	Herstellung der vesikulären Phospholipid Gele aus Tetraether- und Phospholipiden.....	51
3.1.3.	Charakterisierung der Wirkstoffträgersysteme.....	52
3.1.3.1.	Rasterelektronenmikroskopie .....	52
3.1.3.2.	Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie .....	56

3.1.3.3.	Charakterisierung des Fließverhaltens .....	58
<b>3.2.</b>	<b>Wirkstoffträgersysteme aus synthetischen Bolaamphiphilen .....</b>	<b>62</b>
3.2.1.	Charakterisierung der Hydrogele .....	62
3.2.2.	Charakterisierung der Aerogele .....	64
<b>4.</b>	<b>Freisetzung von Methylenblau aus den Wirkstoff-trägersystemen – Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>67</b>
4.1.	Vesikuläre Phospholipid Gele aus Tetraether- und Phospholipiden .....	68
4.2.	Hydro- und Aerogele aus synthetischen Bolaamphiphilen .....	73
<b>5.</b>	<b><i>In vitro</i> Untersuchung von aPDT gegen Bakterien – Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>78</b>
5.1.	aPDT gegen grampositive Bakterien .....	79
5.1.1.	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> .....	79
5.1.2.	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> .....	81
5.2.	aPDT gegen gramnegative Bakterien .....	84
<b>6.</b>	<b><i>In vitro</i> Untersuchung der aPDT gegen Hefen – Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>87</b>
<b>7.</b>	<b><i>Ex vivo</i> Untersuchung der Hämokompatibilität – Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>91</b>
<b>8.</b>	<b>Untersuchung der Verträglichkeit <i>in ovo</i> – Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>94</b>
8.1.	Schleimhautverträglichkeit der Wirkstoffträgersysteme.....	94
8.2.	Langzeitverträglichkeit der Aerogele .....	98
8.3.	Verträglichkeit der photodynamischen Therapie .....	99
<b>9.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>107</b>
<b>10.</b>	<b>Summary.....</b>	<b>112</b>

<b>11. Referenzen .....</b>	<b>116</b>
<b>12. Anhang.....</b>	<b>132</b>
<b>12.1. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>132</b>
<b>12.2. Material und Geräte.....</b>	<b>134</b>
<b>12.3. Publikationsliste.....</b>	<b>138</b>
<b>12.4. Danksagung .....</b>	<b>141</b>
<b>12.5. Erklärung .....</b>	<b>143</b>

# **1. Einleitung**

## **1.1. Infektionen der Haut- und Schleimhaut – ein unterschätztes Risiko?**

Die Haut ist nicht nur das größte Organ des Menschen, sondern bildet gleichzeitig auch eine wichtige Barriere zur Umwelt [1]. Ist sie vorgeburtlich durch den schützenden Uterus noch steril, wird sie beginnend mit der Geburt von verschiedensten Mikroorganismen wie vordergründig Bakterien (u. a. *Cyanebacterium spp.*, *Streptococcus spp.* & *Staphylococcus spp.*) aber auch von Pilzen (u. a. *Malassezia spp.*, *Aspergillus spp.* & *Candida spp.*) besiedelt [2]. Sowohl die Art als auch die Besiedelungsdichte der Mikroorganismen wird durch viele Faktoren wie anatomische Lage, die dort herrschende Feuchtigkeit, die Talg- und Schweißproduktion sowie den Hormonstatus und das Alter der Person bestimmt [3, 4]. Diese natürliche Hautflora bildet zusammen mit den Mikroorganismen im Inneren des Körpers das Mikrobiom des Menschen, dessen wichtige Funktion für den menschlichen Organismus wir erst zu verstehen beginnen [2, 4, 5].

Unter normalen physiologischen Bedingungen herrscht ein empfindliches Gleichgewicht zwischen dem menschlichen Körper und dem Mikrobiom der Haut- und Schleimhaut. Der hohen Anzahl an Mikroorganismen stehen die kutanen antimikrobiellen Abwehrmechanismen der Haut entgegen. Diese Abwehrmechanismen umfassen die mechanische Barriere des *Stratum corneum*, seinen niedrigen Feuchtigkeitsgehalt und nicht zuletzt den oben aufliegenden Lipidfilm mit saurem pH-Wert von etwa 5-5,5. Weiterhin lösen sich durch die Regeneration der Haut tote Keratinozyten ab und entfernen so physikalisch kolonisierende Mikroorganismen. Infektionen sind die Folge eines Ungleichgewichtes dieser Koexistenz [3, 6].

### **1.1.1. Die Rolle von Bakterien bei lokalen Infektionen**

Bakterien, die in der natürlichen Hautflora vorkommen, verhalten sich dem menschlichen Organismus gegenüber meist symbiotisch oder kommensal, d.h. dass ihr Überleben zwar vom menschlichen Organismus abhängt, ihm aber durch ihr Vorhandensein keine Nachteile entstehen [3]. Viele dieser Bakterien sind harmlos und bieten in einigen Fällen wichtigen Schutz vor pathogenen Erregern oder schädlichen Organismen [2]. *Corynebacterium spp.* bilden beispielsweise Fettsäuren aus den ausgeschiedenen Fetten der Talgdrüsen und sind auf diese Weise mit verantwortlich für den sauren pH-Wert der Haut, der wiederum keimhemmend wirkt. Auch



*Staphylococcus spp.* tragen einen Beitrag zur Abwehr bei. So besetzt beispielsweise der in der natürlichen Hautflora vorkommende Keim *Staphylococcus epidermidis* Keratinozytenrezeptoren und hemmt so die Adhäsion von antibiotikaresistenten *Staphylococcus aureus* [2, 3]. Doch unabhängig von ihren nützlichen Eigenschaften, besitzen endogene Bakterien pathogenes Potential. So können *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus hominis* trotz ihrer meist harmlosen Anwesenheit auf der Haut gelegentlich bei Patienten mit intravenösen Kathetern nosokomiale (d. h. im Krankenhaus erworbene) Infektionen verursachen [3].

Generell stellen Wunden ein besonderes Risiko für Infektionen dar. Laut der Wound Healing Society ist eine Wunde das Ergebnis einer „Störung der normalen anatomischen Struktur und Funktion“ [7]. Der Ablauf einer normalen Wundheilung ist ein komplexer Prozess, in dem eine Reihe voneinander abhängiger Vorgänge ineinandergreifen: Beginnend mit der Hämostase folgen Entzündungs-, Migrations-, Proliferations- und Reifungsphase bis die Integrität des beschädigten Gewebes wiederhergestellt ist [7, 8]. Die während der Wundheilung aus der Wunde austretende Flüssigkeit besteht vorwiegend aus Blutplasma mit wenigen zellulären Bestandteilen und wird als Exsudat bezeichnet. Sie ist eine Schlüsselkomponente in allen durchlaufenen Phasen [7]. Da es Proteine enthält und die Wunde kontinuierlich spült, sorgt das Exsudat zum einen für ein feuchtes Wundbett und zum anderen versorgt es die Wunde auch mit Nährstoffen (u. a. Glucose) und bietet so günstige Bedingungen für die Migration und Mitose von Epithelzellen. Darüber hinaus versorgt das Exsudat die Wunde auch mit Leukozyten, die das Bakterienwachstum an der Wundoberfläche kontrollieren und transportiert dabei gleichzeitig Abfallprodukte aus der Wunde hinaus.

Abhängig vom Verlauf des Wundheilungsprozesses werden die Gewebsverletzungen in i) akute und ii) chronische Wunden unterteilt. Akute Wunden (i) umfassen mechanische Verletzungen wie Schürfwunden (Reibungskontakt der Hautoberfläche mit harten Oberflächen), tiefere Wunden (Schnitte oder Schüsse), chirurgische Wunden (chirurgische Schnitte durch bspw. die Entfernung eines Tumors), Verbrennungen sowie chemische Verletzungen (Strahlung, Elektrizität, ätzende Chemikalien und Wärmequellen) [7]. Sie heilen in der Regel nach 8-12 Wochen mit minimaler Narbenbildung vollständig ab. Der Verlust der Hautintegrität und die Exposition von subkutanem Gewebe bieten dabei günstige Bedingungen für das mikrobielle Wachstum [9]. In Abhängigkeit der Wundlokalisation und der Entstehungsart wird dieses mit Bakterien unterschiedlichen Ursprungs kontaminiert.

Mikrobiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die meisten Wunden polymikrobiell sind und sowohl aerobe (Sauerstoff bedürftige) als auch anaerobe (ohne Sauerstoff lebensfähige) Bakterien enthalten [6, 9]. Proliferieren die Bakterien in der Wunde in einem solchen Umfang, dass das Immunsystem des Patienten sie nicht mehr kontrollieren kann, so spricht man von einer Wundinfektion. Wundinfektionen von akuten chirurgischen Wunden machen etwa ein Viertel der nosokomialen Infektionen aus und weisen dabei häufig eine Antibiotikaresistenz auf. Wundinfektionen werden zu ca. 70 % durch *Streptococcus spp.* und *Staphylococcus spp.* hervorgerufen. Als wichtigster Erreger gilt dabei *Staphylococcus aureus* [3, 10], deutlich seltener sind *Escherichia coli* oder *Pseudomonas aeruginosa* die Ursache [11]. Das Bakterium *S. aureus* ist kein natürlicher Bestandteil der Hautflora, dennoch kann es vorübergehend die Haut besiedeln. Bereits bei 20 % aller Neugeborenen besiedelt es die Haut an den vorderen Nasenlöchern und ist im nasalen Mikrobiom von ungefähr 50 % der erwachsenen Bevölkerung anzutreffen [3, 4].

Die Definition einer chronischen Wunde (ii) ist international nicht einheitlich festgelegt, so dass sie meist über die Dauer des Wundheilungsprozesses beschrieben wird. Eine Wunde ist demnach chronisch, wenn sie über den Heilungszeitraum einer akuten Wunde hinaus Bestand hat, also nach einer Dauer von mindestens 3 Monaten noch immer keine Tendenz zur Heilung zeigt [8, 12]. Problematisch an dieser Definition ist die Annahme, dass die Ursache von chronischen Wunden, mit denen von akuten gleichzusetzen ist. Bei den meisten chronischen Wunden verläuft die Wundheilung jedoch durch bestehende Grunderkrankungen des Gewebes (wie z. B. chronisch venöse Insuffizienz oder periphere arterielle Verschlusskrankheit) gestört ab, so dass neben einem guten Wundmanagement auch immer die Grunderkrankung behandelt werden muss [6]. Dennoch muss die Bakterienbelastung der im Vergleich zur akuten Wunde länger andauernden Entzündungsphase, insbesondere an kritischen Stellen, akribisch genau beobachtet und behandelt werden [9, 13].

Die Inzidenz von chronischen Wunden wird in westlichen Industriestaaten mit 1-2 % der Bevölkerung angegeben, nach dem 80. Lebensjahr steigt sie auf 4-5 % [12]. Chronische Wunden umfassen Dekubitalgeschwüre (Druckgeschwüre) und Beingeschwüre (venösen, ischämischen oder traumatischen Ursprungs). Obwohl solche Weichteilinfektionen relativ selten sind, können sie eine ernste Bedrohung für den Patienten und eine erhebliche Belastung für das Gesundheitssystem darstellen. So stiegen die jährlichen Kosten für die Behandlung chronischer Wunden in Deutschland

im Zeitraum von 1997 – 2008 u. a. durch den demografischen Wandel von 3,15 Milliarden auf rund 5 Milliarden Euro an. Denn besonders ältere, pflegebedürftige Patienten aber auch Patienten im Krankenhaus sind von schlecht heilenden Wunden betroffen [14].

Patienten, die infolge einer Chemotherapie immunschwach sind oder an Gefäßverschlusskrankheiten leiden, sind wie bereits erwähnt besonders häufig von tiefen, schlecht heilenden Wunden (Ulcus) betroffen [15]. Ein ebenfalls hohes Risiko tragen Patienten mit Verbrennungen, da die durch die Verbrennung zerstörte Hautbarriere, die mangelnde Durchblutung des betroffenen Gewebes und die Unterdrückung der Immunabwehr durch verabreichte Medikamente häufig zu Wundinfektionen führen. Eine solch chronische Wundinfektion ist vordergründig schwächend und aus Patientensicht traumatisch, kann bei einem Übertritt der Mikroorganismen in den Blutkreislauf aber lebensbedrohlich werden. Eine Vielzahl dieser Patienten verstirbt in der Regel an Komplikationen infolge von Infektionen durch *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* zusammen mit *Candida spp.* und Fadenpilzen [15].

Ein Grund für die beschriebenen Komplikationen in chronischen Wunden ist, dass das sonst sehr wichtige Exsudat durch das Vorhandensein von Ödemen und lang andauernden Entzündungen in übermäßigen Mengen vorhanden ist [7]. Abgesehen von dem vor Jahrzehnten geschlossenen Konsens über die Vorteile einer feuchten Umgebung bei der Wundheilung, besteht nach wie vor ein Bedarf an anpassbaren und bequemeren Wundauflagen [7, 16]. In der klinischen Praxis werden noch oft Verbände aus Baumwolle und/oder topische Produkte für das Wundmanagement verwendet, die das Risiko einer Wundaustrocknung tragen [7]. Moderne Wundauflagen entfernen überschüssiges Exsudat, ohne dabei die gleichen austrocknende Eigenschaften zu besitzen und tragen so zu einer optimalen Wundheilung bei [16]. Insbesondere Hydrogele finden als moderne Wundauflagen großen Zuspruch, da sie viele der wünschenswerten Eigenschaften vereinen. Neben der positiven Eigenschaft Blut und Exsudat aufzunehmen eignen sie sich aufgrund ihres hohen Flüssigkeitsgehaltes auch zur Rehydratisierung des abgestorbenen Gewebes und verbessern so die Wundheilung [7, 17, 18]. Mitunter können auch antibiotische und/oder antifungale Wirkstoffe eingearbeitet werden, um das Bakterienwachstum in der Wunde zu kontrollieren. Ungünstige mechanische Eigenschaften der Hydrogele, ein hohes allergenes Potential als Folge von oft notwendigerweise eingesetzten toxischen Quervernetzern um die gewünschte Struktur und Konsistenz des Trägersystems zu

erhalten, sowie das Nichtvermögen der Bioabbaubarkeit limitieren jedoch ihren Einsatz [7, 19].

Auch Wundauflagen aus gefriergetrockneten Cellulosederivaten, mit oder ohne eingearbeiteten Wirkstoff, finden Einsatz bei tiefen Wunden, da sie die Diffusion von Gasen ermöglichen und mechanischen Schutz bieten, jedoch ist ihre Entfernung aus der Wunde oft mit starken Schmerzen verbunden [20].

Der Markt für Wundauflagen ist in den letzten 20 Jahren erheblich gewachsen, so dass die Entwicklung neuer und effektiverer Materialien für die Herstellung geeigneter Wundauflagen eine hohe Relevanz aufweist [16, 20]. In jüngster Zeit hat daher die Suche nach dem optimalen Wundmanagement und einer adäquaten Therapie mit geeigneten Wirk- und Hilfsstoffen erneut die Aufmerksamkeit vieler Wissenschaftler erregt v. a. da die Anzahl der chronischen Wunden mit Infektionen von antibiotika-resistenten Bakterien weiter zunimmt [7, 9, 21].

#### **1.1.2. Die Rolle von Pilzen bei lokalen Infektionen**

Von den ungefähr 300.000 bekannten Pilzarten wurden ungefähr 200 als mögliche Krankheitserreger für den Menschen beschrieben, doch weniger als 10 % davon sind pathogene Pilze, die bei Menschen mit einem gesunden Immunsystem invasive Krankheiten verursachen [22]. Dennoch sind Pilzinfektionen weltweit ein zunehmendes Gesundheitsproblem, von dem sowohl immun kompetente als auch immunsuppressive Patienten betroffen sind [23]. Bedingt durch den häufigeren Einsatz von Breitbandantibiotika und immunsuppressiven Medikamenten hat die Inzidenz von Pilzinfektionen in den letzten Jahrzehnten zugenommen [18, 24, 25]. Opportunistische Pilzpathogene der Gattungen *Candida*, *Aspergillus* und *Cryptococcus* sind in der Lage lokale Haut- sowie Schleimhautmykosen zu verursachen, die insbesondere bei Hochrisikogruppen, wie HIV-positiven Patienten und Krebspatienten unter Chemotherapie, häufig zu systemischen Mykosen führen können [26-28]. 2019 lag die Inzidenz für Pilzinfektionen in Deutschland etwa bei 10 %, wobei oberflächliche Haut- und Nagelmykosen dominierten [25]. Aufgrund der zunehmenden Resistenzen ist die Therapie sehr herausfordernd, so dass sich die zunächst lokale Infektion in der Folge zur systemischen Infektion ausdehnen kann [18].

Hefen aus der Gattung *Candida* sind die Hauptursache für Pilzinfektionen [24, 25, 28, 29]. Die Gattung umfasst mindestens 30 Arten die als klinisch bedeutend angesehen werden, doch Candidamykosen werden vordergründig durch *C. albicans*, *C. krusei*, oder *C. glabrata* ausgelöst [29]. Obwohl *C. albicans* in der menschlichen Hautflora vorkommt, ist es mit einer Inzidenz von 45-50 % innerhalb der Gattung *Candida* der virulenteste Vertreter. Er befällt insbesondere Schleimhäute im Mund, aber auch den Magen-Darm-Trakt sowie Schleimhäute im Urogenitalbereich [30]. Durch sein optimales Wachstumsverhalten bei 37 °C, seine Adhäsion an Endothelzellen und die Möglichkeit Proteasen sowie Phospholipasen auszusekretieren, die das Gewebe schädigen, ist er in der Lage besonders schwere oberflächliche, aber auch systemische Mykosen auszulösen, indem er die Hautbarriere durchbricht. Obwohl Risikofaktoren wie orale Candidose, ein langer Krankenhausaufenthalt und parenterale Ernährung bekannt sind, werden systemische Mykosen Schätzungen nach nur in etwa 50 % aller Fälle zu Lebzeiten der Patienten diagnostiziert und zählen somit zu den häufigsten übersehenen Todesursachen bei Intensivpatienten [24, 25]. Orale Candidose ist vor allem bei HIV-Patienten die häufigste Mykose, die bei einer ausbleibenden Behandlung tödlich enden kann [28]. Selbst bei einer scheinbar kurativen Behandlung mit topischen oder oralen Antimykotika wie Nystatin, Amphotericin B oder Fluconazol ist die Rückfallrate mit 30-50 % innerhalb der nächsten 14 Tage nach Beendigung der Therapie bei stark immunschwachen Patienten hoch [30].

Seit 2009 breitet sich eine neue *Candida* Art – *C. auris* – global aus und die hohe Anzahl an den durch *C. auris* ausgelösten nosokomialen Infektionen veranlasste das öffentliche Gesundheitswesen dazu, Warnungen auszusprechen [25]. Da Pilze ebenso wie der menschliche Organismus aus eukaryotischen Zellen bestehen, wird die Forschung und Entwicklung neuer Antimykotika durch den Mangel an selektiven mikrobiellen Zielen erschwert [31]. Bedingt durch den Anstieg an Krankheitserregern, die begrenzte Anzahl an verfügbaren Arzneimitteln gegen Mykosen und den besorgniserregend stark zunehmenden Resistenzen vieler *Candida* Gattungen, insbesondere *C. albicans*, rücken alternative Therapieansätze mehr denn je in den Fokus der Wissenschaft [30, 32].

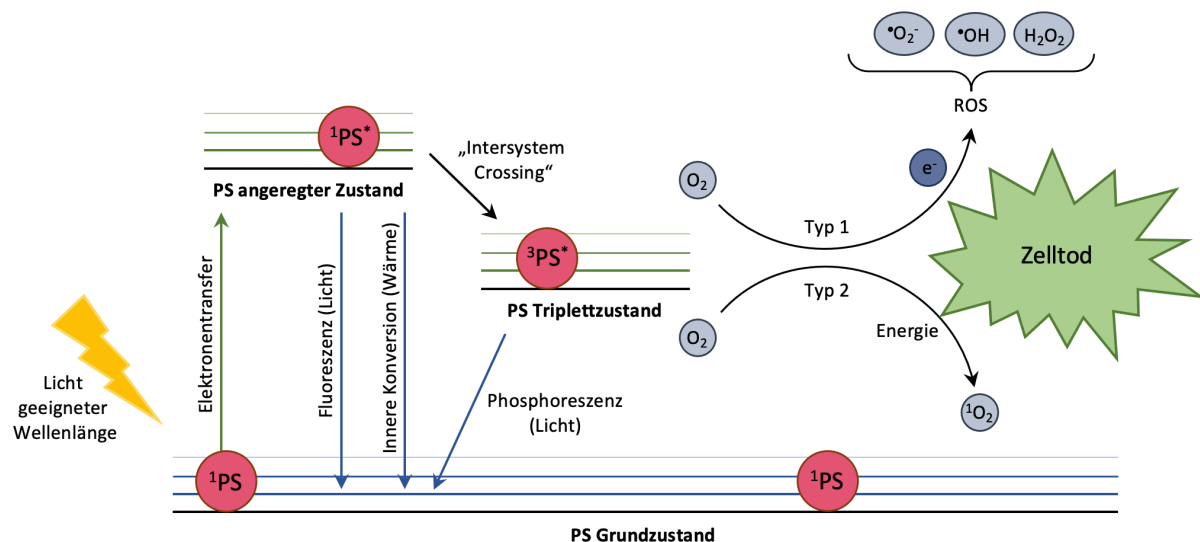
## 1.2. Grundlagen der Photodynamische Therapie

Einen modernen Therapieansatz zur Bekämpfung von Haut- und Schleimhautinfektionen mit resistenten Mikroorganismen bietet die Photodynamische Therapie (PDT). Bereits im späten 19. Jahrhundert beobachteten Wissenschaftler, dass die Einnahme von bestimmten Medikamenten oder Pflanzen unabhängig von ihrer eingesetzten Konzentration so lange harmlos blieb, bis sich die Patienten nachträglich dem Sonnenlicht aussetzten. Es war allerdings Oskar Raab, der unter der Leitung seines Doktorvaters Prof. Hermann von Tappeiner, dem damaligen Leiter der Abteilung für experimentelle Pharmakologie an der Universität München, den wirkungsverstärkenden Effekt des Lichtes im Jahr 1897 zum ersten Mal therapeutisch nutzte. Raab stellte fest, dass die Toxizität von Acridinorange gegenüber *Paramecium caudatum* (Pantoffeltierchen) je nach Intensität des Sonnenlichts im Labor variierte. Im Verlauf seiner Dissertation konnte er zeigen, dass niedrige Konzentrationen von Acridinorange und anderen fluoreszierenden Verbindungen wie Chinin und Eosin, die im Dunkeln keine Wirkung hatten, im Licht einen toxischen Effekt auf das Pantoffeltierchen zeigten, Licht allein jedoch keine Wirkung besaß. Seine Doktorarbeit wurde 1900 veröffentlicht [33]. 1904 prägte von Tappeiner schließlich erstmals den Begriff der „Photodynamische Reaktion“ [34].

Der Wirkmechanismus der PDT fußt auf dem Zusammenspiel von drei wichtigen voneinander abhängigen Faktoren. Zunächst wird dem Patienten ein für sich genommen ungiftiges Arzneimittel – der sogenannte Photosensitizer (PS) – entweder systemisch, lokal oder topisch verabreicht. Im Anschluss erfolgt die Beleuchtung des zu behandelnden Areals oder Tumors, mit Licht einer spezifischen Wellenlänge, was in Gegenwart von Sauerstoff die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, engl. reactive oxygen species) zur Folge hat. Die Bildung dieser ROS führt im weiteren Verlauf schließlich zum Zelltod und zur Gewebeerstörung [35]. Lichtquellen, die für die PDT geeignet sind, variieren von einfachen Lampen über diverse Laser-Geräte bis zu niedrig dosierter Lichttherapie mit Leuchtdioden (LED, engl. light-emitting diode) [36]. Die Bestrahlung mit LED bietet dabei viele Vorteile gegenüber den anderen Strahlungsquellen. So ist sie unter anderem energieeffizienter, erzeugt weniger Wärmeenergie und ist kostengünstiger als ein Laser-Gerät, was sie für die Nutzung in der modernen PDT sehr interessant macht [37, 38].

Auch wenn der Wirkmechanismus der PDT im 19. Jahrhundert noch unbekannt war, dauerte es nicht lange bis erste therapeutische Versuche an Patienten durchgeführt wurden. Zusammen mit Albert Jesionek, einem Oberarzt an der Klinik für Dermatologie der Universität München, begann von Tappeiner bereits 1903 mit der photodynamischen Behandlung von Psoriasis (Schuppenflechte), Pityriasis versicolor (Kleienpilzflechte), sowie Dellwarzen und Hauttumoren. Im Jahr 1905 erweiterte er das Therapiespektrum mit der Behandlung von oberflächlichem Hautkrebs [34].

Obwohl die Anwendungsbereiche der PDT sehr unterschiedlich erscheinen, so eint sie der zugrundeliegende photochemische und photophysikalische Mechanismus. Die Prozesse der Lichtabsorption und Energieübertragung sind in Abbildung 1 graphisch dargestellt.



**Abbildung 1:** Graphische Darstellung des photochemischen und photophysikalischen Mechanismus der PDT

PS sind molekulare Strukturen, die durch ein ausgedehntes System konjugierter Doppelbindungen gekennzeichnet sind, in dem die enthaltenen  $\pi$ -Elektronen delocalisiert vorliegen [26]. In seinem Grundzustand besitzt der  $^1PS$  zwei Elektronen mit entgegengesetzten Spins im niederenergetischen Molekülorbital (MO) (Singulettzustand). Werden nun Photonen (Licht) absorbiert, so wird eines der im höchsten besetzten MO befindlichen Elektronen zum niedrigsten unbesetzten MO angehoben, ohne jedoch seinen Spin zu verändern (angeregter Zustand  $^1PS^*$ ). Während seiner kurzen Lebenszeit von wenigen Nanosekunden kann es die gewonnene Energie entweder durch die Emission von Licht (Fluoreszenz), durch Wärme (innere Konversion) oder durch das sogenannte „Intersystem Crossing“ abbauen. Letzterer

Vorgang ist für die photodynamische Therapie von großer Bedeutung, weil dabei der angeregte  $^1\text{PS}^*$  unter Spinkkehr in den angeregten Triplettzustand ( $^3\text{PS}^*$ ) fällt [35]. In diesem relativ langlebigen Zustand (Mikrosekunden) kann der angeregte  $^3\text{PS}^*$  neben dem eigentlich „spinverbotenen“ Prozess der Lichtemission (Phosphoreszenz) zwei Arten von Reaktionen eingehen, um in seinen Grundzustand zurück zu kehren. Bei der Typ-1 Reaktion reagiert der  $^3\text{PS}^*$  direkt mit einem Molekül (z. B. aus der Zellmembran) und überträgt dabei entweder ein Proton oder ein Elektron, um ein Radikalanion bzw. Radikalkation zu bilden. Durch die Reaktion mit Sauerstoff erzeugen diese Radikale in der Folge ROS wie Superoxidradikale ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) und Hydroxylradikale ( $\cdot\text{OH}$ ). Alternativ kann  $^3\text{PS}^*$  in der Typ-2 Reaktion seine Energie direkt auf molekularen Sauerstoff übertragen und Singulett-Sauerstoff bilden. Beide Reaktionen können in Abhängigkeit des verwendeten PS sowie der Sauerstoffkonzentration gleichzeitig ablaufen [39]. Die produzierten Sauerstoffspezies sind hoch reaktiv und schädigen in biologischen Systemen in Abhängigkeit von Art und Konzentration des verwendeten PS, den Bestrahlungsbedingungen, der Sauerstoffkonzentration und dem vorliegenden Biosystem verschiedene Strukturen innerhalb des Zielorganismus, was in der Folge zu dessen Absterben führt. Die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff ist aufgrund seiner Reaktivität sehr kurz. In lipophilen Medien beträgt die Lebensdauer 50-100  $\mu\text{s}$ ; in hydrophilen Medien lediglich 3,5  $\mu\text{s}$ . Die Lebensdauer innerhalb der Zelle verringert sich aufgrund der hohen Reaktivität mit biologischen Substanzen auf etwa 20 ns, so dass nur Strukturen geschädigt werden können, die sich zum Zeitpunkt der Singulett-Sauerstoff-erzeugung in 10 nm Reichweite befinden (etwa die Dicke einer Zellmembran) [40-45].

### **1.3. Methylenblau als Photosensitizer**

Die ersten Experimente der PDT im 19. Jahrhundert führte man mit Farbstoffen wie Chinidin, Acridinorange und Eosin durch, war jedoch nur mäßig mit den daraus resultierenden Ergebnissen zufrieden [34]. Da zur gleichen Zeit ein reges Interesse an der photobiologischen Forschung aufkam, fanden ebenfalls Untersuchungen der PDT-Eignung von fluoreszierenden Pflanzenfarbstoffen statt. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum Pflanzenfarbstoff Chlorophyll, wurden Porphyrine bald in den Fokus gerückt, da sie eine bessere PDT-Aktivität aufwiesen als die bisher verwendeten Farbstoffe [34]. 1841 synthetisierte Johann Joseph von Scherer Hematoporphyrin, indem er Eisen aus Blut (Häm) entfernte und das gewonnene Produkt anschließend



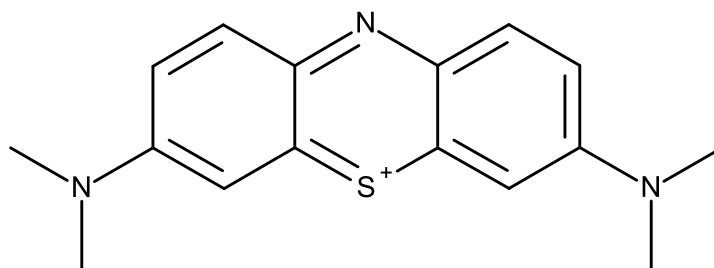
mit Wasser behandelte [39]. Die erste Generation therapeutisch genutzter PS für die PDT basierte infolgedessen auf Hematoporphyrinderivaten, u. a. Photofrin®, das heute noch in der Krebstherapie zugelassen ist [39,46]. Doch die fehlende Reproduzierbarkeit der Synthesen, die hohe und langanhaltende Photosensitivität der Patienten von bis zu 8 Wochen und ein schlechtes Absorptionsspektrum bei 630 nm führten erneut zu Anstrengungen, bessere PS zu entwickeln [35].

Geprägt durch diese negativen Aspekte von Hematoporphyrinderivaten wuchsen die Ansprüche an den idealen PS. Er sollte mit leicht zugänglichen Ausgangsmaterialien unkompliziert zu synthetisieren und eine reine, chemisch stabile Verbindung sein. Aus naheliegenden Gründen ist zudem eine geringe Toxizität sowohl für Menschen als auch für Versuchstiere bei Abwesenheit von Licht wünschenswert (geringe Darktoxizität) [27]. Die langanhaltende Photosensitivität der Patienten unter der Therapie mit Hämatoporphyrinderivaten sollte in Zukunft mit einer möglichst kurzen Verweildauer des PS im Organismus umgangen werden. Außerdem ist eine enge maximale Absorption im Wellenlängenbereich des therapeutischen Fensters zwischen 630 nm und 850 nm und eine gleichzeitig hohe Ausbeute an Singulett-Sauerstoff und ROS unabdinglich, um eine gezielte Therapie zu ermöglichen. Das therapeutische Fenster zwischen 630 nm und 850 nm wird anhand physikalischer und biologischer Vorgänge festgelegt. Die Absorption von Wellenlängen unterhalb von 630 nm durch den PS wird durch die in der Haut vorkommenden Chromophore, Hämoglobin und Melanin, erschwert. Ab einer Wellenlänge über 850 nm sind die einfallenden Photonen zu energiearm, um eine photochemische Reaktion auszulösen und den PS in seinen Triplettzustand anzuheben [35]. Schlussendlich wäre ein kurzes Intervall zwischen Applikation und Beleuchtung sowohl patientenfreundlich als auch kostengünstig, da es eine ambulante Therapie ermöglicht.

Den Grundstein für einen erfolgreichen PS, der viele dieser Voraussetzungen erfüllt, legte damals Paul Ehrlich im späten 19. Jahrhundert mit der Entdeckung des vom Chemiker Heinrich Caro erstmals 1876 synthetisierten Farbstoffes Methylenblau (MB) (Strukturformel siehe Abbildung 2) als Mittel gegen Malaria und zog so dieses Molekül in den Blickpunkt der Wissenschaft [47]. Aufgrund seiner unvermeidlichen Nebenwirkungen bei der systemischen Behandlung der Malaria – grüner Urin und Blaufärbung der Lederhaut – wurde es bald durch das noch heute verwendete Chloroquin abgelöst. MB diente in den darauffolgenden Jahren sowohl als Vorläufer der modernen Antipsychotika Promethazin bzw. Chlorpromazin, sowie als geeignetes Antidot bei Nitrit- und Anilinvergiftungen (heute zugelassen als ProveBlue®), indem

es die schnellere Umwandlung des Methämoglobins zu Hämoglobin bewirkt. Noch heute ist dieses vielseitige Molekül Gegenstand der Forschung für immer neue Anwendungsgebiete [48].

Neuere Erkenntnisse zeigen beispielsweise, dass MB bei geringer Konzentration unter anderem in der Lage ist die Hypotonie bei septischem Schock umzukehren und sowohl bei starker Vasoplegie nach kardiopulmonalem Bypass, als auch in einigen Fällen des anaphylaktischen Schocks hilfreich ist [48]. Der Grund dafür liegt in seiner Fähigkeit die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) zu unterbinden, indem es das Enzym „Stickoxidsynthase“ direkt in ihrem aktiven Zentrum hemmt. Das durch dieses Enzym produzierte NO stimuliert die lösliche Guanylatcyclase welche Guanosintriphosphat (GTP) in cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) umwandelt. Hohe Konzentrationen cGMP führen schließlich über eine Kaskade von Proteinkinasen zu einer Vasodilatation der glatten Muskulatur. Aufgrund der Hemmung der Vasodilatation durch MB in den Blutgefäßen kommt es in der Folge zu einer Steigerung des Sauerstoffpartialdrucks im Blut und zu einer erhöhten vaskuläre Reaktivität gegenüber endogenen Katecholaminen (Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin) [47, 48].



**Abbildung 2:** Strukturformel des Photosensitizers Methylenblau (MB)

Die Verwendung von MB als PS war bereits 1928 bekannt, aber erst in der frühen Nachkriegszeit wurde der Wirkstoff in der Krebstherapie eingesetzt [47]. Der effiziente Singulett-Sauerstoffproduzent MB tritt normalerweise als Kation auf und absorbiert aufgrund seines planaren, trizyklischen Phenothiazin-Grundgerüsts Wellenlängen von 550-700 nm. Sein Absorptionsmaximum liegt bei 664 nm und damit genau im therapeutischen Fenster zwischen 630 nm und 850 nm [27]. Zudem zeigt es eine sehr gute orale Bioverfügbarkeit von 73 % und verbleibt etwa für zehn Stunden im Organismus, bevor es ausgeschieden wird. In Bezug auf die Toxikologie wurde festgestellt, dass nach einer intravenösen (i. v.) Gabe von mehr als 7 mg/kg

Körpergewicht bei erwachsenen Personen schwere gastrointestinale Störungen auftraten und das Risiko für hämolytische Ereignisse zunahm [48, 49]. Ab einer Konzentration von 7,5 mg/kg Körpergewicht traten Hyperpyrexie und ab 20 mg/kg Körpergewicht Hypotension auf, die teilweise lebensbedrohlich waren [48]. Frühe Arbeiten von Link *et al.* zeigten, dass MB die nützliche Eigenschaft besitzt, Melanom-Metastasen zu markieren, wenn er i. v. verabreicht wird [50]. Diese Markierung der Melanomzellen geht auf die hohe Affinität von MB gegenüber des Biopolymers Melanin zurück [46]. Aufgrund dessen wird der Wirkstoff zur frühen Detektion von Hautkrebs noch heute klinisch eingesetzt.

Zusätzlich besitzt MB selbst antibakterielle Eigenschaften, weshalb es in der Schweiz in Kombination mit Naphazolin als Augentropfen zur Behandlung von unspezifischer Bindehautentzündung zugelassen ist (Collyre Bleu Laiter®). Klinisch wird es zur photodynamischen Behandlung chronischer Parodontitis eingesetzt [39]. Parodontitis ist eine durch Bakterien induzierte, entzündliche Erkrankung des Zahnfleischgewebes, die in ihrem fortschreitenden Krankheitsverlauf zur Ausbildung von parodontalen Taschen, Zerstörung der zahntragenden knöchernen Strukturen und schließlich zum Verlust des betroffenen Zahnes führen kann [51, 52]. In Industrienationen sind 30-50 % der Erwachsenen von Parodontitis betroffen, 10 % von ihnen mit schweren Symptomen [52]. Durch die Taschenbildung während des Krankheitsverlaufes ist die restlose Beseitigung der verursachenden Bakterien mit großem Aufwand verbunden. Schmerzen durch die Behandlung und die anschließend hohe Dosierung von Antibiotika bringen unerwünschte Nebenwirkungen und bakterielle Resistenzentwicklung mit sich [53]. Doch der direkt in die Parodontaltasche applizierte flüssige oder in einer viskosen Arzneiform befindliche PS kann nach Aktivierung durch Bestrahlung die Erreger wirksam abtöten (siehe Kapitel 1.4.1.1). Eine 2006 durchgeführte Studie von Soukos *et al.* zeigte, dass die PDT mit in Lösung befindlichem MB (25 µg/mL MB-Lösung, 665 nm Wellenlänge, 30 J/cm<sup>2</sup> Fluenz) in der Lage war, nahezu alle Bakterien in der Parodontaltasche abzutöten [54].

Im selben Jahr beobachtete die Arbeitsgruppe um Antonio O. C. Jorge, dass MB in Gegenwart von Laserstrahlung die Anzahl an Hefepilzen der Gattung *Candida* reduzieren konnte (88,6 % Reduktion von *C. albicans*) [55]. Munin *et al.* bestätigten ein Jahr später, dass eine PDT mit MB die Bildung der Keimröhrchen von *C. albicans* hemmen kann und kamen so zu dem Schluss, dass die Therapie die Pathogenität der Hefen beeinflusst [56]. Bestärkt durch diese Erkenntnisse wurde die Behandlung von

oralen Candidosen mit MB tiefergehend betrachtet [30, 31, 57]. 2009 konnte in Maus- und Rattenmodellen gezeigt werden, dass MB *in vivo* effektiv *Candida* Erreger im Mundraum abtötet [58]. 2016 entdeckte die Arbeitsgruppe um Saif Hameed, dass diese antimykotische Wirkung nicht nur durch die Bestrahlung mit Licht induziert wird, sondern dass MB auch ohne Bestrahlung eine mitochondriale Dysfunktion und eine Störung der Redox- und Membranhomöostase in *C. albicans* Stämmen hervorruft, was zu einer Reduktion des Wachstums und/oder zum Absterben des Organismus führt [57]. Die Anwendung von MB gegen orale Candidosen ist vom klinischen Alltag jedoch noch weit entfernt. Nichts desto trotz stößt die Anwendung von MB bei bakteriellen und Pilzinfektionen auf reges wissenschaftliches Interesse und die Forschung auf diesem Gebiet nimmt seit einigen Jahren stetig zu [50, 53, 59-62].

#### **1.4. Antimikrobielle Photodynamische Therapie – aPDT**

Seit der Etablierung des Begriffes „Photodynamische Wirkung“ durch van Tappeiner ist inzwischen mehr als ein Jahrhundert vergangen. Die PDT zur Behandlung von Tumoren hat seitdem bereits in Krankenhäusern Einzug gehalten [15]. Doch obwohl die PDT mit der Entdeckung an Mikroorganismen begann, untersucht die Wissenschaft den praktischen Anwendungsfall bei der Therapie entsprechender Krankheitserreger erst seit wenigen Jahren intensiver [40]. Dieser Umstand liegt nicht zuletzt an den rasch zunehmend auftretenden Resistenzen vieler Mikroorganismen gegenüber den konventionellen Therapien. Die PDT an Mikroorganismen hat in der Literatur verschiedene Bezeichnungen. In Abhängigkeit der zugrundeliegenden Quelle sind neben dem in der Folge verwendeten Terminus „antimicrobial photodynamic therapy“ (aPDT) auch „photodynamic inactivation“ (PDI) oder „photodynamic antimicrobial chemotherapy“ (PACT) gebräuchlich.

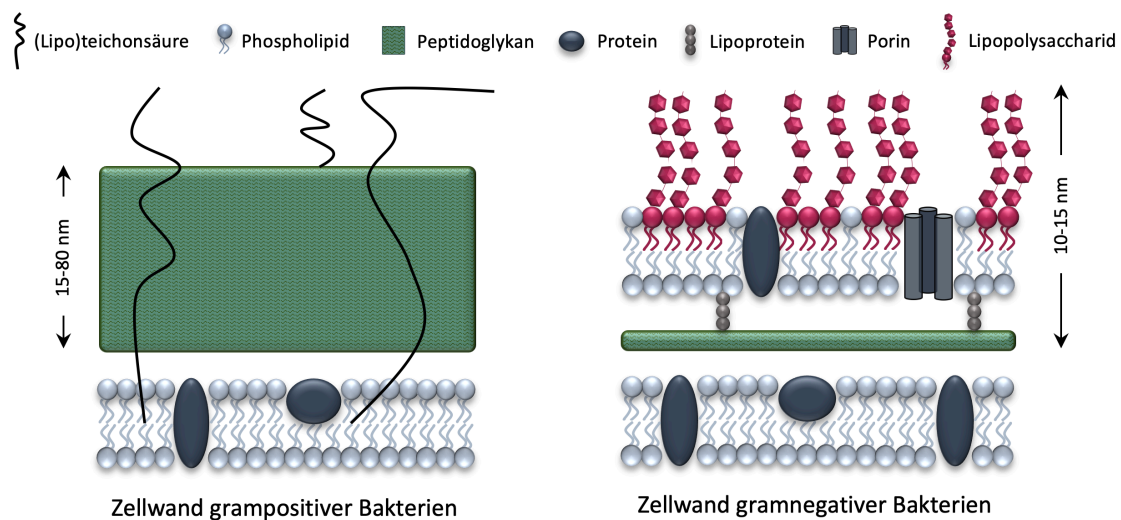
##### **1.4.1. aPDT und Bakterien**

Die unangemessene Verschreibung von Antibiotika, insbesondere bei Viruserkrankungen, das Versäumnis von Patienten ihrer Behandlung und Medikation konsequent zu folgen, sowie nicht zuletzt die weit verbreitete Verwendung von Antibiotika in Viehfuttermitteln sind nur einige Gründe, die Antibiotikaresistenzen bei vielen pathogenen Bakterien begünstigen [15, 63]. Die weltweite Zunahme multiresistenter Bakterien führte zu großen Anstrengungen alternative, sichere und

effiziente antimikrobielle Strategien zu entwickeln. Die aPDT könnte als Alternative zu der konventionellen Antibiotikatherapie eine vielversprechende Möglichkeit sein.

#### 1.4.1.1. Wirkung der aPDT auf Bakterien

Bei der praktischen Anwendung der aPDT mit den aus der Krebstherapie bekannten PS wurde festgestellt, dass einige Krankheitserreger, insbesondere gramnegative Bakterien, schlechter auf die Therapie ansprechen als grampositive [64]. Der Grund dafür liegt im unterschiedlichen Aufbau der Zellwand beider Mikroorganismen (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Graphische Darstellung des unterschiedlichen Aufbaus der Bakterienzellwand.

Grampositive Bakterien besitzen eine Zellwand, die aus bis zu 100 Schichten Peptidoglykan besteht und in der Teichonsäuren eingelagert sind. Weiterhin ist die Zellwand mit Lipoteichonsäuren durchzogen, die in der Zytoplasmamembran verankert sind. Die Zellwand selbst stellt für Makromoleküle mit molaren Massen von 30.000-60.000 Da keine Barriere dar, so dass für die meisten PS mit einer durchschnittlichen molaren Masse von 1500-1800 Da die Zytoplasmamembran als Zielstruktur leicht zugänglich ist.

Gramnegative Bakterien hingegen haben als Besonderheit eine aus lediglich ein bis zwei Schichten Peptidoglykan bestehende dünne Zellwand, auf die zusätzlich eine zweite (äußere) Membran aufgelagert ist. Hierbei handelt es sich um eine asymmetrische Lipiddoppelschicht, die aus einer äußeren Lage negativ geladener Lipopolysaccharide (LPS) und einer inneren Lage Phospholipide besteht. Die äußere

Membran ist über spezielle Lipoproteine, welche in der inneren Phospholipid-Schicht verankert sind, kovalent an das Peptidoglykan der Zellwand gebunden und stellt für viele PS eine Barriere dar. Im Gegensatz zur Zytoplasmamembran ist sie lediglich für kleinere Substratmoleküle wie Zucker, Ionen oder Aminosäuren relativ durchlässig, was auf spezielle Kanalproteine (Porine) zurückzuführen ist. Entlang eines Konzentrationsgefälles können dort hydrophile Substanzen bis zu einer molaren Masse von etwa 600-700 Da transportiert werden [65]. Aufgrund der negativen Ladung der äußeren Membran durch die enthaltenen LPS können sich jedoch kationische PS wie MB an die Membran der Pathogene anlagern und diese teilweise penetrieren, so dass eine gewisse Selektivität gegenüber den körpereigenen Zellen des Patienten vorherrscht [52, 66].

Ein Vorteil der aPDT im Gegensatz zur konventionellen Antibiotikatherapie ist das Fehlen von spezifischen Zielstrukturen innerhalb der Mikroorganismen, so dass das Risiko einer Bildung von Resistenzen seitens der Erreger minimiert wird [42]. Der Wirkmechanismus der aPDT fußt auf der Bildung von ROS und hat damit ein sehr weites Wirkspektrum. Sowohl extra- als auch intrazellulär akkumulierter PS ist in der Lage unter Lichteinfluss mit der Bildung von ROS zu reagieren, welches im Anschluss neben der Schädigung von Zellbestandteilen und DNA hauptsächlich die Zytoplasmamembran schädigt [42]. Durch die Reaktion der ROS mit den Zytoplasmamembranlipiden kommt es in der Folge zu einer Peroxidation der Lipide und damit zu einer gesteigerten Permeabilität für Natrium- und Kalium-Ionen. Zusätzlich erfolgt die Inaktivierung der in der Zytoplasmamembran enthaltenen Proteine, die für den Ionenaustausch verantwortlich sind. Beide Schädigungen führen insgesamt zu einem Verlust der Stabilität und somit, als Folge des zunehmend hohen Zellinnendrucks, zum Austritt von Zellbestandteilen aus dem Bakterium und zu dessen Absterben [67].

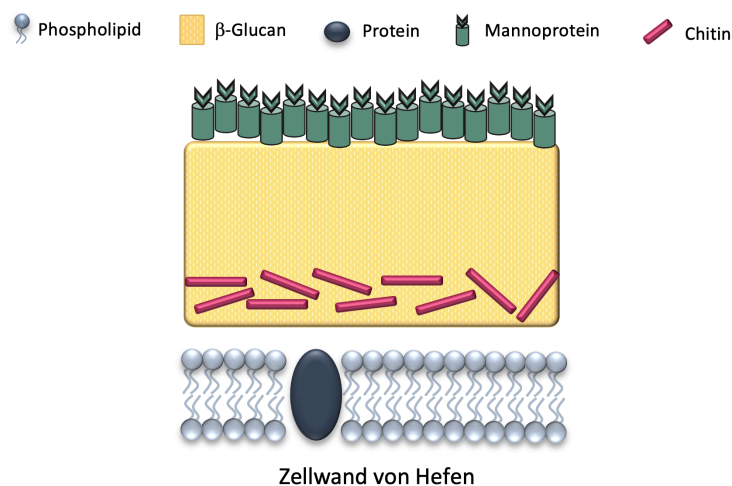
Durch die Bildung von antioxidativen Enzymen (u. a. Superoxid-Dismutase und Peroxidase) gelingt es jedoch wenigen Bakterienstämmen, den durch die aPDT entstehenden oxidativen Stress besser zu tolerieren als anderen Stämme ihrer Art [42]. Aufgrund der im Zellinneren etwa 20 ns kurzen Halbwertszeit der entstehenden ROS und den hohen PS Konzentrationen ist es aber unwahrscheinlich, dass Bakterien effektive Resistenzen entwickeln werden.

### 1.4.2. aPDT und Hefen

Zur Behandlung von Mykosen stehen wie eingangs erwähnt nur begrenzt Arzneimittel zur Verfügung. Der vermehrte Einsatz von „Azolen“, wie beispielsweise Fluconazol, führte zur zunehmenden Resistenz der Hefen gegenüber der konventionellen Therapie mit klassischen Antimykotika. Sowohl *Candida albicans* als auch *Candida krusei* und *Candida glabrata* sind resistent gegen Fluconazol [32]. Bereits 1995 wurde geschätzt, dass die Behandlung von etwa 81 % der von *C. albicans* befallenen HIV-Patienten aufgrund von Resistenzen gegen diese Arzneimittelgruppe erschwert war [28]. Analog zur bakteriellen aPDT konnte auch hier gezeigt werden, dass resistente *C. albicans* Stämme sensitiv gegenüber der Lichttherapie reagierten [32].

#### 1.4.2.1. Wirkung der aPDT auf Hefen

Hefepilze gehören wie Säugetiere zu den Eukaryoten. Im Gegensatz zu Säugetierzellen sind Hefezellen jedoch von einer starren zweischichtigen Zellwand umgeben, die verschiedene Funktionen, wie die Kontrolle der Zellpermeabilität und den Schutz der Zelle vor osmotischem und mechanischem Stress, übernimmt (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Graphische Darstellung der Zellwand von Hefen.

Die Zellwand ist durch einen periplasmatischen Raum von der Zytoplasmamembran getrennt. Die Hauptkomponenten der außen liegenden Zellwand bestehen aus einem  $\beta$ -1,3-Glucan-Chitin-Gerüst, das zu Form und Stabilität der Zellwand beiträgt. Das starre, wasserunlösliche Chitin ist dabei nah an der Zytoplasmamembran antiparallel zu den  $\beta$ -Glucanen angeordnet und für die Festigkeit verantwortlich [29]. Neben den

im Inneren der Zellwand vorherrschenden  $\beta$ -1,3-Glucanen, sind  $\beta$ -1,6-Glucane mit langen Seitenketten variabler Länge über die gesamte Zellwand verteilt und verbinden mit Hilfe von Wasserstoffbrückenbindungen das  $\beta$ -1,3-Glucan-Chitin-Gerüst mit den auf der äußeren Zellwand befindlichen Mannanproteinen. Mannane sind im Vergleich zu  $\beta$ -Glucanen und Chitin weniger starr und nicht an der Bestimmung der Zellform beteiligt, jedoch weisen sie eine geringere Permeabilität und Porosität auf, so dass sie die Aufnahme von Fremdstoffen in die Zelle beeinflussen [29]. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Aufnahme von PS durch die Zellwand positiv durch das Vorhandensein von elektrisch geladenen Gruppen und einer hohen Hydrophilie beeinflusst wird, während sie für lipophile PS eine höhere Barriere darstellt [27].

Im Gegensatz zu prokaryotischen Zellen, sind eukaryotische Zellen komplexer aufgebaut, so dass der PS nach der Aufnahme in die Zelle in weitere Zellkompartimente (Mitochondrien, Endoplasmatisches Reticulum etc.) verteilt wird. Ein entscheidender Faktor für den Erfolg der aPDT ist aufgrund der geringen Lebensdauer der bei der Bestrahlung entstehenden ROS die Lokalisation des PS in oder auf der Hefezelle [44]. Nach der ROS-Erzeugung kommt es durch die Inaktivierung von Enzymen und Proteinen, sowie die Peroxidation von Lipiden zu einer Lyse von Zellmembranen, Lysosomen und Mitochondrien [27, 44, 68]. Die Vielzahl der Schäden an den Zellorganellen in der Hefezelle und die erhöhte Permeabilität der Membran durch innere und äußere Schäden stellen die unmittelbare Ursache für die in der Folge eingeleitete Apoptose dar [27, 41, 43, 45, 64, 68]. Die Schädigung der DNA spielt aufgrund des Vorhandenseins der Kernmembran und damit der erschwerten Erreichbarkeit für den PS nur eine untergeordnete Rolle [44, 64, 68]. In Abhängigkeit der produzierten ROS und dem Grad der Schädigung kann es neben der Einleitung der Apoptose ebenfalls zur unerwünschten Autophagie kommen [23]. Bei diesem Prozess verwertet die Hefezelle die geschädigten Zellorganellen durch Abbau neu und stirbt nicht ab.

Die ursprünglich gegen die klassischen Antimykotika entwickelten Resistenzmechanismen vieler Hefen (einschließlich *Candida spp.*) eignen sich bedauerlicherweise ebenso, der aPDT entgegen zu wirken. So fand die Arbeitsgruppe um Tim Maisch heraus, dass *C. albicans* Stämme mit überexprimierten Effluxpumpen toleranter gegenüber der aPDT mit MB zu sein scheinen als der Wildtyp [28]. Die beiden Haupt-Efflux-Systeme in Pilzen bilden die „ATP-binding cassette“ (ABC) und die „major facilitator super family“ (MFS). Beide Systeme sind am aktiven Transport



von MB aus der Hefezelle beteiligt. Der Effekt bei den Hefen mit ABC-Überexpression war hingegen stärker ausgeprägt als bei einer MFS-Überexpression; sie waren resistent gegen die MB-vermittelte aPDT. Zwar konnte die phototoxische Wirkung des MB durch den ABC-Inhibitor Verapamil wieder verstärkt werden, nicht jedoch durch den MFS-Inhibitor INF271. Es wird daher angenommen, dass MFS auch an der Aufnahme von MB in die Zelle beteiligt sein könnte [26, 28]. Zudem sind Hefen, analog zu den Bakterien, in der Lage antioxidative Enzyme zu bilden, um den durch die aPDT entstehenden oxidativen Stress besser zu tolerieren [26, 28, 42]. Durch eine hohe Dosis an PS können diese Mechanismen außer Kraft gesetzt werden. Die Bildung von spezifischen Resistenzen gegen die aPDT ist dank der vielen Angriffspunkte in den Hefezellen sowie durch die kurze Halbwertszeit von gebildetem ROS jedoch gering.

### 1.5. Bolaamphiphile

Den Namen „Bola“ bekamen die Bolaamphiphile durch die gleichnamige Waffe indigener Völker, die aus zwei oder drei Kugeln besteht, welche durch eine Schnur miteinander verbunden sind. Noch heute verwenden argentinische Hirten die sog. „boleadoras“ zum Fangen ihrer Rinder (siehe Abbildung 5) [69]. In Analogie tragen bolaamphiphile Moleküle an beiden Enden eines hydrophoben Gerüsts zwei hydrophile Gruppen [70]. Diese Kopfgruppen können dabei identisch sein (symmetrische Bolaamphiphile) oder sich in Größe, Ladung und/oder Polarität unterscheiden (asymmetrische Bolaamphiphile).



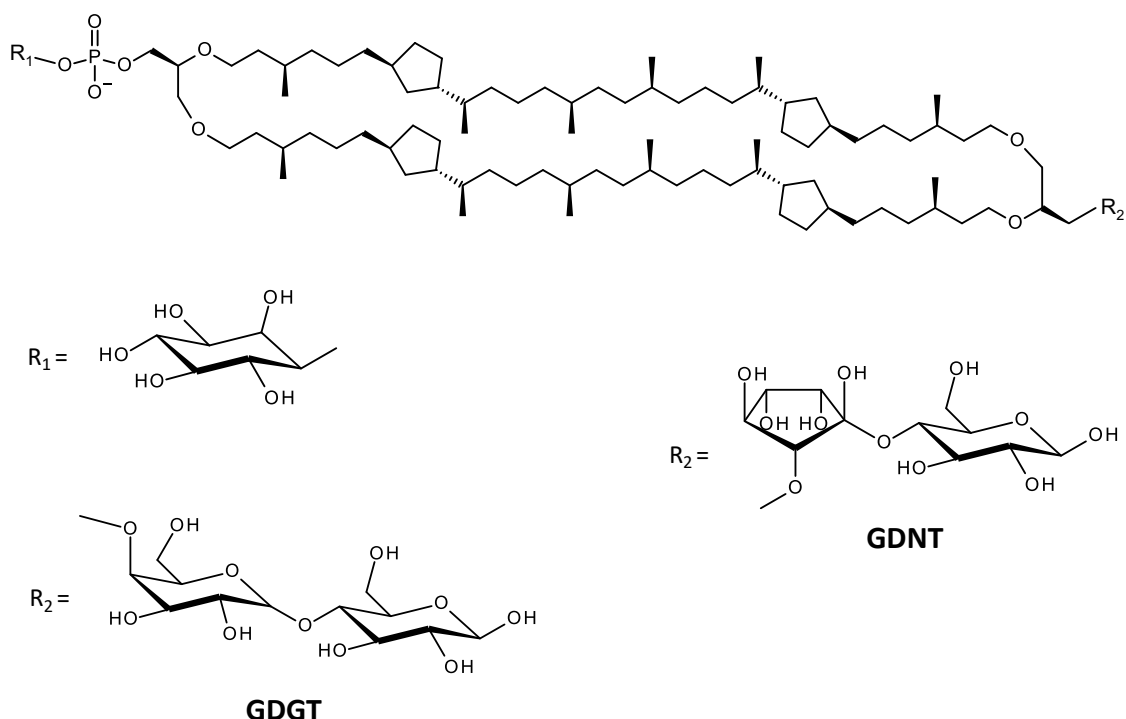
**Abbildung 5:** Südamerikanische Bola (links) [71] sowie schematische Darstellung von symmetrischen und asymmetrischen Bolaamphiphilen (rechts).

### 1.5.1. Natürliche Bolaamphiphile – Tetraetherlipide

Erstmals wurden bolaamphiphile Lipide in den Membranen bestimmter Arten von Archaea entdeckt [72]. Archaea sind eine Klasse von Organismen, die weder den Bakteria noch den Eukaryota zugeordnet werden und die in der Lage sind unter extremen Bedingungen zu wachsen. Je nach Lebensraum und Lebensgrundlage unterscheidet man Halophile, Methanogene und Thermophile Archaea [73]. Während Halophile für ihr Wachstum eine hohe Salzkonzentration benötigen, können Methanogene nur unter strengen anaeroben Bedingungen wachsen und Methan aus einfachen Quellen wie  $H_2$  und  $CO_2$  produzieren. Von besonderem Interesse für die Nutzung von bolaamphiphilen Lipiden ist jedoch die Unterart der Thermophilen. Die den Thermophilen zugeordnete Art *Sulfolobus acidocaldarius* kommt in extremen ökologischen Nischen wie heißen, sauren Quellen vor. Für ein optimales Wachstum benötigt dieser Organismus einen pH-Wert von weniger als 3,0 sowie Temperaturen von ca. 65 °C bis 90 °C, weshalb *Sulfolobus acidocaldarius* unter anderem im Yellowstone-Nationalpark, in der Dominikanischen Republik und in Italien nachgewiesen wurde [74]. Um in diesen extremen Lebensräumen alle notwendigen biologischen Funktionen aufrecht erhalten zu können, benötigen Archaea besonders stabile Membranen. Deshalb wurden seit der Beschreibung der ersten archaealen Lipide in den 1960er Jahren diverse Archaea untersucht und eine Vielzahl von Strukturen entdeckt [75]. Mittlerweile ist bekannt, dass sich die Membrankomponenten der Archaea im Gegensatz zu den in Eukaryoten und Bakterien vorkommenden Phospholipiden durch ihre besondere chemische Struktur auszeichnen. Während die bakterielle und eukaryotische Membran eine Phospholipid-Doppelschicht bildet, besitzt die archaeale Membran nur eine Monolipid-Schicht. Die Kohlenstoffketten der Archaea Lipide sind dabei aus gesättigten Isoprenoid-Einheiten zusammengesetzt, welche mit dem Glycerophosphat-Rückgrat über Etherbrücken verknüpft sind. Im Gegensatz zu der Esterbindung bei Eukaryoten und Bakterien ist die Etherbindung über einen breiten pH-Bereich stabil. Weiterhin kann die Kohlenstoffkette entweder verzweigte Methylgruppen oder Cyclopentan-Strukturen enthalten, was zum einen die Kristallisationsneigung und zum anderen bei hohen Temperaturen die Membranfluidität geringhält. Auch das Glycerophosphat-Rückgrat unterscheidet sich von dem in Bakterien und Eukaryoten. Während das Glycerophosphat-Rückgrat von bakteriellen Lipiden aus sn-Glycerin-3-Phosphat besteht, findet man in Archaea sn-Glycerin-1-Phosphat. Das Vorhandensein dieses Enantiomers und die Tatsache, dass die Kohlenwasserstoffkette der Archaea an einer anderen Stelle der

Glycerineinheit gebunden wird als in bakteriellen oder eukaryotischen Lipiden, macht sie unempfindlicher gegenüber Enzymen [75, 76]. Nicht zuletzt besitzen die Lipide an ihren Kopfgruppen Zuckerreste, welche durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen die Membran zusätzlich stabilisieren. Diese archaealen Etherlipide werden wiederum in zwei Arten unterschieden: Dietherlipide (DEL) und Tetraetherlipide (TEL). Die Häufigkeit der vorkommenden Etherlipide ist von der Art der Archaea abhängig. Während in der Membran von Halophilen nur DEL gefunden werden, findet man beide Etherlipid-Arten in typischen Methanogenen (50-100 % DEL, 0-50 % TEL) und Thermoacidophilen (5-10 % DEL, 90-95 % TEL) [77]. Die bolaamphiphilen TEL können aus den Membranen technisch mittels Chloroform-Methanol-Extraktion ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH-Extraktion) gewonnen und durch weitere Aufreinigung des gewonnenen Extraktes mit Hilfe von Säulenchromatographie anschließend die einzelnen Lipidfraktionen voneinander getrennt werden [78].

Die lyophilisierten Zellen des thermoacidophilen Organismus *Sulfolobus acidocaldarius* enthalten ungefähr 10 % (m/m) Gesamtlipide, worunter 70 % polare, 10 % weniger polare und 20 % neutrale Lipide fallen [79, 80]. Die isolierte, polare Lipidfraktion E (PLFE) besteht wiederum zu 90 % aus Glycerol-dialkyl-nonitol-tetraether (GDNT / Calditocaldarcheol) und zu 10 % aus Glycerol-dialkyl-glyceryl-tetraether (GDGT / Caldarcheol). Diese beiden Grundtypen der bolaamphiphilen TEL bestehen aus zwei  $\text{C}_{40}$ -Ketten (Biphytanylketten), welche wie oben beschrieben über Etherbindungen an ein Glycerolmolekül geknüpft sind. An einem Ende der Bolaamphiphile befindet sich eine Phosphatidyl-myo-inositol-Gruppe, am anderen Ende besitzt GDNT eine ringförmige Nonitolgruppe (Calditolgruppe), welche mit  $\beta$ -D-Glucose verknüpft ist. Im Gegensatz dazu weist GDGT stattdessen eine  $\beta$ -D-Galactosyl-D-Glucose Gruppe auf [75, 79, 80]. Die Strukturformeln von GDNT und GDGT sind in Abbildung 6 dargestellt.



**Abbildung 6:** Chemische Strukturen der bolaamphiphilen Tetraetherlipide GDNT (Glycerol-Dialkyl-Nonitol-Tetraether) und GDGT (Glycerol-Dialkyl-Glyceryl-Tetraether) [81].

#### 1.5.1.1. Tetraetherlipide als Wirkstoffträgersysteme

Aufgrund der oben beschriebenen, vorteilhaften Eigenschaften wie u. a. der thermischen und mechanischen Stabilität, ist die Nutzung von natürlichen TEL für moderne Wirkstoffträgersysteme besonders reizvoll. Weiterhin wurde festgestellt, dass die aus Archaea isolierten TEL für den tierischen Organismus untoxisch sind und über die Leber schnell ausgeschieden werden können, so dass eine i. v. Gabe oder ein bei der topischen Behandlung von Schleimhautinfektionen möglicher Übergang der Lipide in den Blutkreislauf kein Problem darstellt [82].

Bereits frühe Studien zeigten, dass TEL verschiedene molekulare Konformationen einnehmen können. Man unterscheidet dabei die aufrechte, von der hufeisenförmigen Konformation, wobei jedoch die aufrechte Form bevorzugt auftritt [72, 83]. An der Grenzfläche von Wasser und Luft wurde dieses Phänomen ebenfalls beschrieben [84]. 1990 gelang es schließlich erstmals Shi-Lung Lo und E. L. Chang zu zeigen, dass die mit Hilfe von CHCl<sub>3</sub>:MeOH aus *Sulfolobus acidocaldarius* isolierten TEL in wässrigem Medium spontan multilamellare Vesikel bilden können und diese Eigenschaft wurde in der Folge weiter untersucht [75, 78, 83-87]. Bei näherer Betrachtung konnte festgestellt werden, dass je nach Herstellungsart die Bildung von 60-800 nm großen,

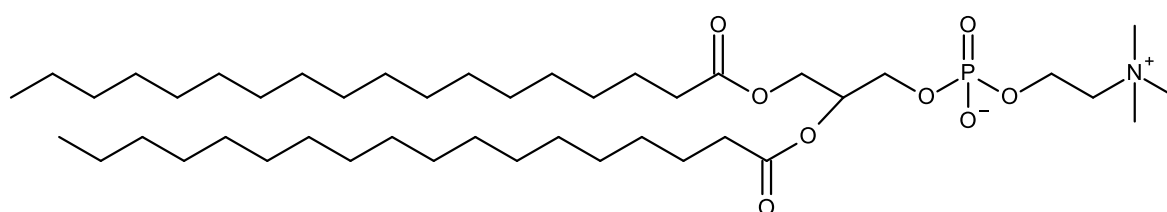
stabilen unilamellaren Vesikeln, multilamellaren Vesikeln oder riesigen unilamellaren Vesikeln (10-150  $\mu\text{m}$ ) möglich war, die möglicherweise als Depot-Arzneiformen nutzbar sind. Dabei überspannen die TEL die gesamte Lamellenstruktur und bildeten stabile Lipidmonoschichten aus [78, 81, 85]. Neben der Bildung von unterschiedlich großen Vesikeln, wurden auch mizellare und lamellare Strukturen von TEL beschrieben (siehe Abbildung 8 auf Seite 25) [72, 77, 88].

Reine TEL-Vesikel sind bemerkenswert stabil und bleiben auch im Temperaturbereich von 25-55 °C über mehrere Monate unverändert. Es ist außerdem möglich sie zu autoklavieren, ohne dass sie in Größe und Form Veränderungen aufweisen [85]. Diese Eigenschaft ist auf die im Vergleich zu Phospholipid-Doppelschichten (siehe dazu 1.5.1.2) enge und starre Struktur der Lipidmonoschicht zurückzuführen [78]. Durch das Vorhandensein der verzweigten Methylgruppen, der Cyclopentaneinheiten und der Etherbindung sind die von beiden hydrophilen Kopfgruppen begrenzten Kohlenstoffketten der Bolaamphiphile sehr starr und weniger beweglich, als bei Phospholipiden. Mit den vielfältig vorhandenen Van-der-Waals Bindungen zwischen den Ketten zum einen und den Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Kopfgruppen mit den enthaltenen Zuckern und Phosphatgruppen zum anderen, ist die Bindung zwischen den einzelnen TEL-Molekülen sehr stark ausgeprägt [85]. Die Membranfluidität von TEL-Lipiden nimmt deshalb erst mit Temperaturen nahe der physiologischen Wachstumstemperatur von *Sulfolobus acidocaldarius* (65-90 °C) zu [85].

#### **1.5.1.2. Wirkstoffträgersysteme aus herkömmlichen Phospholipiden**

Phospholipide sind amphiphile Moleküle und bestehen aus einem Glycerolmolekül (Rückgrat), welches an C1 und C2 mit Fettsäuren (Schwanzgruppe) und an C3 über eine Phosphodiesterbindung mit einem Alkohol (Kopfgruppe) verestert ist. Die Kohlenstoffketten der Fettsäuren bilden dabei den apolaren Teil, der Alkohol den polaren Teil des Moleküls. Die Kopfgruppe kann dabei entweder geladen, oder ungeladen vorliegen und bestimmt die Hydrophilie des Phospholipids. In Abhängigkeit der Temperatur können Phospholipide in zwei verschiedenen Zuständen vorliegen. Man unterscheidet den Gel-Zustand, der durch eine dichte Packung der Kohlenstoffketten gekennzeichnet ist, vom flüssigkristallinen Zustand, in dem die Ketten ungeordnet vorliegen. Die Temperatur, bei der ein Übergang vom Gel-Zustand in den flüssigkristallinen Zustand auftritt, wird als Phasenübergangstemperatur ( $T_c$ ) bezeichnet [89].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin (DSPC), ein zwitterionisches, synthetisches Phospholipid genutzt (Strukturformel siehe Abbildung 7). Der apolare Teil besteht aus zwei C<sub>18</sub> Fettsäuren (Stearinsäure), die über das Glycerolrückgrat an ein zwitterionisches Phosphatidylcholin gebunden sind.



**Abbildung 7:** Chemische Struktur des in dieser Arbeit genutzten Phospholipids DSPC.

Aufgrund seines amphiphilen Charakters bildet DSPC im wässrigen Milieu, ähnlich selbstorganisiert wie TEL, supramolekulare Strukturen wie Mizellen, sog. „Disks“ (flache Scheiben) und Liposomen aus (siehe Abbildung 8 auf Seite 25). Liposomen sind definitionsgemäß Vesikel von 20 nm bis mehreren µm Größe, die ein wässriges Kompartiment mit einer oder mehrerer Lipiddoppelschichten einschließen (entgegengesetzt zu den mit TEL gebildeten Monolipidschichten) [90]. Dies und der Umstand, dass natürliche Phospholipide als Hauptbestandteil aller Zellmembranen eine ausgezeichnete Biokompatibilität aufweisen, macht sie als moderne Wirkstoffträgersysteme interessant [91].

Liposomen wurden 1964 erstmals von Bangham & Horne beschrieben sowie elektronenmikroskopisch dargestellt und im Anschluss von Gregoriadis *et al.* 1971 erfolgreich als Abgabesysteme für bioaktive Substanzen eingesetzt [90, 92]. 1990 war die erste injizierbare, liposomale Formulierung auf dem europäischen Markt erhältlich (Amphotericin B-Liposomen – AmBisome®) und 1995 fand das erste liposomale Chemotherapeutikum Doxil® (Doxorubicin-Liposomen) durch eine Zulassung der Food and Drug Administration (FDA) ihren Weg in den klinischen Alltag [91].

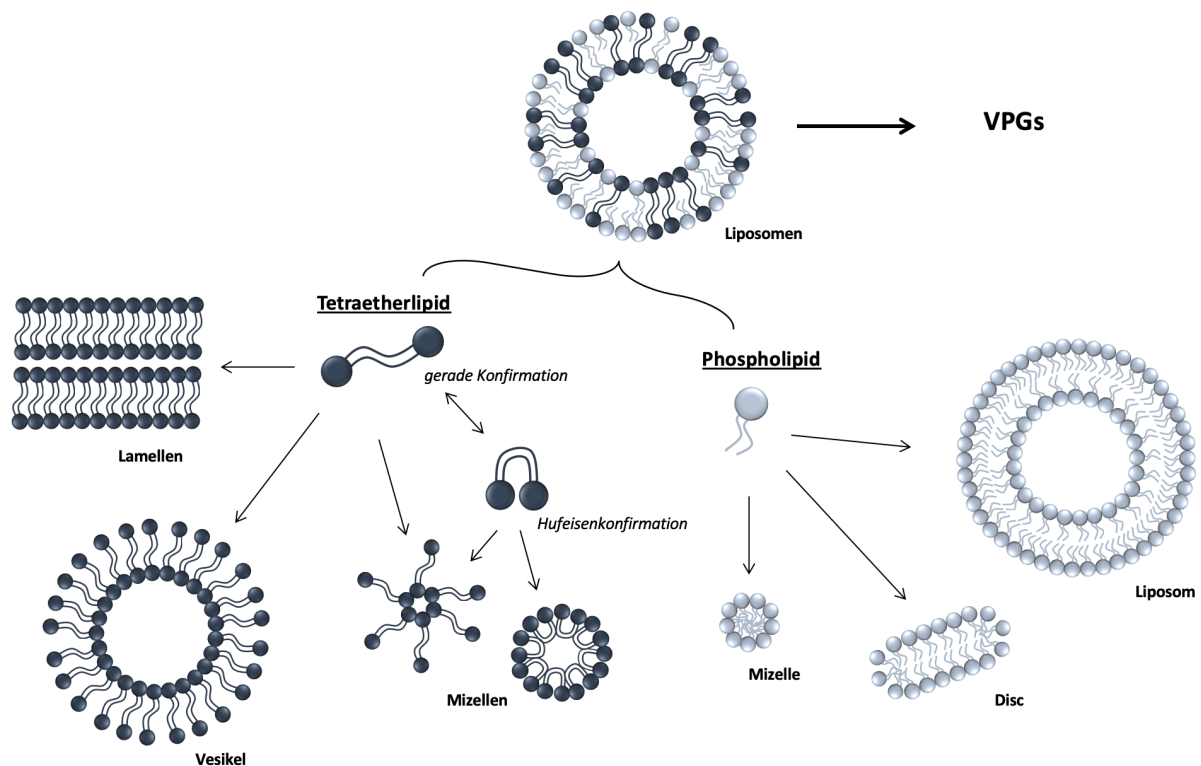
Die Tatsache, dass die bolaamphiphilen TEL mit Phospholipiden mischbar sind und mit ihnen stabile Liposomen ausbilden können, rückte die Untersuchung dieser Mischliposomen als innovative Wirkstoffträgersysteme in jüngster Zeit in den Fokus der Forschung auf dem Gebiet der pharmazeutischen Technologie [37, 78, 83, 81, 93, 94]. In Abhängigkeit des TEL-Gehalts variieren die aus

Phospholipiden und TEL hergestellten Liposomen in der Größe. Es konnte festgestellt werden, dass Vesikel aus Phospholipiden mit zunehmenden Mengen TEL an Größe zunehmen, und dass diese die von den Phospholipiden gebildete Lipid-Doppelschicht überspannten [78, 95].

#### **1.5.1.3. Vesikuläre Phospholipid Gele – VPGs**

Eine Weiterentwicklung der Liposomen als Wirkstoffträgersysteme stellen die vesikulären Phospholipid Gele (VPGs) dar. VPGs sind hochkonzentrierte, halbfeste Dispersionen aus Phospholipiden in einem wässrigen Medium und wurden erstmals von Brandl *et al.* 1997 beschrieben [96]. Sie bestehen hauptsächlich aus dicht gepackten Vesikeln, die das wässrige Medium einschließen. Aufgrund der sehr dichten Packungsparameter und der damit einhergehenden sterischen Abschirmung zwischen den hydrophilen Kopfgruppen der in den Vesikeln enthaltenen Phospholipide, kommt es zu einer Verfestigung des wässrigen Mediums [97]. Der Einsatz von 35-45 % (m/m) Phospholipid führt bei VPGs zu einer homogenen Verteilung von kleineren Vesikeln, während bei höheren Konzentrationen eine heterogene Struktur aus größeren Vesikeln und Lamellenstapeln beobachtet wurde [98, 99]. Diese Strukturen erlauben es, eine große Arzneistoffmenge einzuschließen, da sowohl im Medium gelöste hydrophile als auch die in der Wand der Vesikel vorliegende lipophile Wirkstoffe eingeschlossen werden können.

Bisher ist jedoch noch keine Untersuchung von VPGs mit TEL-Phospholipid-Mischvesikeln bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden daher VPGs aus DSPC und unterschiedlichen Anteilen bolaamphiphilen TEL hergestellt und charakterisiert.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der aus Tetraetherlipiden und Phospholipiden im wässrigen Millieu selbstorganisierten supramolekularen Strukturen, die als Wirkstoffträgersysteme genutzt werden können.

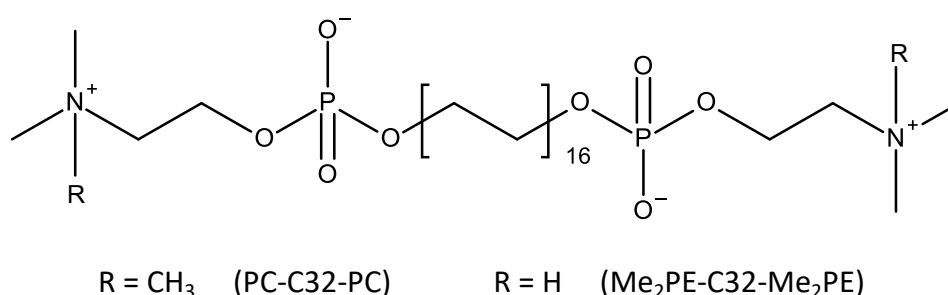
### 1.5.2. Synthetische Bolaamphiphile

Die Isolierung von natürlichen Bolaamphiphilen aus Archaea ist teuer und führt häufig zu einer Mischung von bolaamphiphilen Lipiden mit unterschiedlichem Alkylkettenmuster und Kopfgruppen. Weiterhin ist die Ausbeute der für die zur Entwicklung von Wirkstoffträgersystemen nutzbaren PLFE mit nur etwa 4 % sehr gering [85]. Eine wertvolle und vorteilhafte Alternative zu natürlichen Bolaamphiphilen bilden daher die synthetischen Analoga [100-102]. In den frühen 1980ern begann man Bolaamphiphile zu synthetisieren indem man versuchte die ungewöhnliche Architektur ihrer natürlichen Vorbilder zu kopieren, dabei jedoch üblicherweise nicht deren Bausteine nutzte, weil diese schwer zu synthetisieren sind [70, 103]. In der pharmazeutischen Technologie finden synthetische Bolaamphiphile vielfältige Einsatzmöglichkeiten, wie z. B. als Molekülschablonen für die Synthese von Nanomaterialien wie u. a. Nanoröhrchen, als Biosensoren in der Medizin und nicht zuletzt als moderne Wirkstoffträgersysteme [104].



### 1.5.2.1. Synthetische Bolaamphiphile als Wirkstoffträgersysteme

Eine besondere Klasse der synthetischen Bolaamphiphile sind solche, die zwischen ihren beiden Kopfgruppen nur eine einzige Kohlenstoffkette besitzen. Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Substanzen Dotriacontan-1,1'-Diylbis[2-(Trimethylammino)ethyl Phosphat] (PC-C32-PC) und Dotriacontan-1,1'-Diylbis[2-(Dimethylammino)ethyl Phosphat] (Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE) bestehen aus einer langen C<sub>32</sub>-Alkylkette und zwei Kopfgruppen aus Phosphocholin (PC) bzw. Dimethylphosphoethanolamin (Me<sub>2</sub>PE). Die chemischen Strukturen sind in Abbildung 9 dargestellt.



**Abbildung 9:** Chemische Struktur der beiden synthetischen Bolaamphiphile PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE [105].

Anders als ihre natürlichen Vorbilder, sind weder PC-C32-PC noch Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE mit Phospholipiden mischbar und daher nicht in der Lage, die im wässrigen Medium durch Phospholipide gebildeten doppelschichtigen Strukturen zu stabilisieren [106]. Zurückzuführen ist dies auf den großen Platzbedarf der PC- bzw. Me<sub>2</sub>PE-Kopfgruppe im Vergleich zu der kleinen Querschnittsfläche der Alkylkette. Offensichtlich führt die Inkorporation der synthetischen Bolaamphiphile in eine Phospholipid-Doppelschicht zu großen Hohlräumen zwischen den einzelnen Lipiden, so dass die Bolaamphiphile eine für sie energetisch günstigere Konformation bevorzugen [107].

Bereits 2004 berichteten Köhler *et al.* über das Auftreten von Gelbildung von Dispersionen des synthetischen bolaamphiphilen Lipids PC-C32-PC in hochreinem Wasser. Zwei Jahre später konnte dieses Phänomen ebenfalls bei Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE beobachtet werden [108, 109]. Die Gelbildung dieser synthetischen Bolaamphiphile beruht auf ihrer Eigenschaft der selbstorganisierten Bildung von Nanofasern im wässrigen Medium. In Abhängigkeit der Konzentration des bolaamphiphilen Lipids und des pH-Wertes des umgebenden Dispersionsmittels bilden sie ein ausgedehntes Netzwerk an verschränkten, helikalen Nanofasern von 6-7 nm Dicke, in der die

hydrophoben Ketten in engen Kontakt kommen [108-110]. Diese Selbstorganisation der Nanofasern wird hauptsächlich durch hydrophobe Van-der-Waals Wechselwirkungen der langen Alkylketten verursacht. Die bereits erwähnten großen Kopfgruppen verhindern dabei die vollständig parallele Packung der Alkylkette, so dass sich benachbarte Moleküle relativ zueinander verdrehen müssen [105]. Beide Kopfgruppen der Bolaamphiphile sind außerdem in der Lage, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, welche die Struktur der Nanofasern stabilisieren. In der Folge kommt es durch die Interaktion der Fasern mit dem umgebenden Medium und die Bindung der Wassermoleküle an die Kopfgruppen zur Gelbildung. Frühere Charakterisierungen von PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE zeigten bereits eine Gelbildung mit Konzentrationen von weniger als 1 mg/mL Lipid [105, 111]. Doch obwohl sie durch ihr verhältnismäßig niedriges Molekulargewicht im Vergleich zu konventionellen Hydrogelbildnern wie Hydroxyethylcellulose (HEC), das Fehlen von toxischen Quervernetzern und dem großen Wasserbindevermögen großes Potential als moderne Gelbildner besitzen, wurde die Eignung von PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE als Hilfsstoffe für die pharmazeutische Technologie bisher noch nicht wissenschaftlich untersucht.

## 1.6. Zielsetzung der Arbeit

Sowohl durch Bakterien induzierte Wundinfektionen als auch durch Hefen verursachte Infektionen der Schleimhäute sind zunehmend ernste Risiken für betroffene Patienten, da bekannte Therapien aufgrund der bisweilen gehäuft auftretenden Resistenzen der Mikroorganismen an ihre Grenze stoßen. Zusätzlich stellt die adäquate Wundversorgung mit geeigneten Wundauflagen eine Herausforderung dar. Die Kombination aus einer zielgerichteten und erfolgreichen Therapie zum einen und haut- und schleimhautverträglichen Trägersystemen zum anderen stellt einen guten Ansatz dar, diese neuen Herausforderungen zu meistern.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es daher, neuartige und stabile Wirkstoffträgersysteme auf der Basis von bolaamphiphilen Lipiden zu generieren, welche die folgenden Eigenschaften aufweisen:

- Fähigkeit einer kontrollierten Wirkstofffreisetzung
- Eignung für den Einsatz in der photodynamischen Therapie gegen Mikroorganismen
- Anwendbarkeit auf Haut- und Schleimhaut mit sehr guter Verträglichkeit für den Patienten

Gleichzeitig sollten dabei die aus natürlichen und synthetischen Bolaamphiphilen hergestellten Wirkstoffträgersysteme einander gegenübergestellt werden.

Zunächst wurden die Trägersysteme hergestellt und charakterisiert. Die Schwerpunkte der in diesem Arbeitsschritt erreichten Erfolge bilden dabei:

- die Gewinnung natürlicher Tetraetherlipide aus der Biomasse von *Sulfolobus acidocaldarius*
- die Entwicklung stabiler Wirkstoffträgersysteme auf der Basis von bolaamphiphilen Tetraetherlipiden und synthetischen Bolaamphiphilen
- die Strukturaufklärung selbiger mittels Rasterelektronen- und cryo-Transmissionselektronenmikroskopie sowie die Bestimmung der jeweiligen Fließeigenschaften durch rheologische Messungen

- die Integration des bereits antimikrobiell erprobten Wirkstoffes Methylenblau in die Trägersysteme und abschließend die Evaluation der kontrollierten Freisetzung aus den Gelen

Im Anschluss erfolgte die quantitative Bestimmung der adäquaten Wirksamkeit der mit Methylenblau versetzten Wirkstoffträgersysteme gegen Mikroorganismen mit Hilfe des Agar-Diffusions-Test durch:

- *in vitro* angewandte aPDT gegen grampositive Kokken – *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* (DSM 18669) und *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 25923)
- *in vitro* angewandte aPDT gegen gramnegative Stäbchen – *Escherichia coli* (DH5α)
- *in vitro* angewandte aPDT gegen Hefezellen – *Saccharomyces cerevisiae*

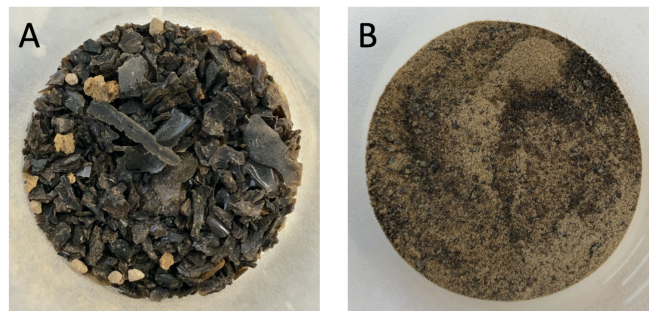
Um abschließend eine gute Verträglichkeit der Trägersysteme für eine mögliche Verwendbarkeit in der Praxis zu gewährleisten, fand die Beurteilung dieser Parameter unter der Anwendung von nachfolgenden Methoden statt:

- die Bestimmung des hämolytischen Potentials durch Untersuchung an menschlichen Erythrozyten *ex vivo*
- die Evaluation der Schleimhaut- und Langzeitverträglichkeit *in ovo* unter Einbezug des Chorioallantois-Membran-Modells
- die Charakterisierung der Verträglichkeit der *in ovo* angewandten aPDT ebenfalls unter Einbezug des Chorioallantois-Membran-Modells

## 2. Methoden

### 2.1. Herstellung der Wirkstoffträgersysteme aus natürlichen Bolaamphiphilen

Als Ausgangsmaterial der unten aufgeführten Extraktionsmethode des Gesamtlipidextraktes (GLE) der Tetraetherlipide (TEL) diente die von der Firma „Surface & Interface Technologies, Rosenhof GmbH“ (Heiligenstadt, Deutschland) bezogene, gefriergetrocknete Biomasse der Archaea Gattung *Sulfolobus acidocaldarius*. Die Biomasse wurde unmittelbar vor der Extraktion gemörsert, um eine möglichst große Kontaktfläche zum Extraktionsmittel und somit eine möglichst hohe Ausbeute an TEL zu generieren.



**Abbildung 10:** Gefriergetrocknete Biomasse von *Sulfolobus acidocaldarius* vor (A) und nach dem Mörsern (B).

#### 2.1.1. Gewinnung der Tetraetherlipide aus *Sulfolobus acidocaldarius*

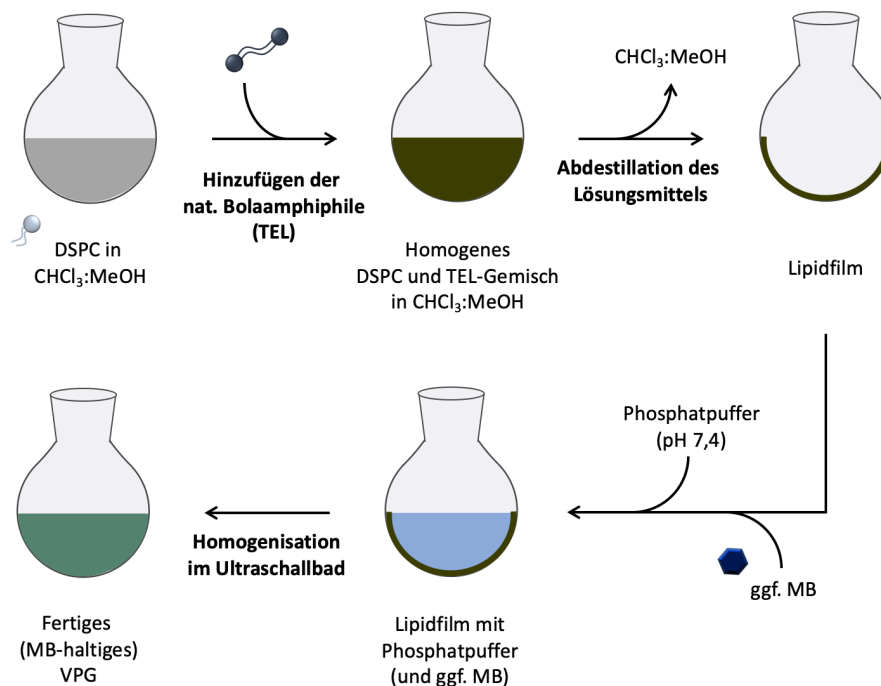
Die Gewinnung des Lipidextraktes aus *Sulfolobus acidocaldarius* fand mittels konventioneller Extraktion statt, bei der 6,5 g der gefriergetrockneten, gemörserten Archaea-Biomasse eingewogen wurden. Als Extraktionsmittel dienten 600 mL eines Lösungsmittelgemisches aus  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (80:20 v/v), welches sich in einem 1L Rundkolben befand, der an einen Rückflusskühler (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) angeschlossen war. Das Gemisch aus gemörserter Biomasse und Lösungsmittel kochte für 24 Stunden unter Rückfluss bei +80 °C in einem Ölbad. Nach erfolgreicher Abtrennung der Schwebstoffe mittels Filterpapiers konnte das zur Extraktion genutzte, nun überschüssige Extraktionsmittel aus dem Filtrat mit Unterstützung des Rotationsverdampfers (Heidolph Laboroto 4001, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) entfernt werden. Die im Kolben zurückbleibende Masse der Lipide wurden in der Folge gravimetrisch bestimmt. Die Gewinnung der für die weiteren Versuche genutzten Stammlösung, erfolgte durch

Rücklösen des Lipidfilmes in einer definierten Menge  $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$  (80:20 v/v). Die Ausbeute betrug im Mittel 391,80 mg.

### **2.1.2. Herstellung der vesikulären Phospholipid Gele aus Tetraether- und Phospholipiden**

Verschiedene Kombinationen aus 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin (DSPC) (gesponsert durch TransMIT GmbH, TransMIT-Projektbereich für kolloidale Arzneimittelformulierungen, Gießen, Deutschland) und der natürlichen bolaamphiphilen TEL dienten als Grundlage für die Herstellung der vesikulären Phospholipid Gele (VPGs). Gewählt wurden die Verhältnisse DSPC:TEL 80:20 (m/m), DSPC:TEL 70:30 (m/m), DSPC:TEL 50:50 (m/m), sowie reine DSPC-haltige VPGs mit jeweils einer Gesamtlipidkonzentration von 100 mg/mL. Das genutzte Verfahren zur Bildung der Wirkstoffträgersysteme erfolgte angelehnt an die Filmbildungs-Rehydratations-Methode zur Herstellung von Liposomen, die ebenfalls für die Herstellung von VPGs herangezogen werden kann [98, 112]. Nach Einwaage der benötigten Menge DSPC in einen 5 mL Rundkolben, wurde selbiges mit 1 mL  $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$  (80:20 v/v) in Lösung gebracht. Anschließend konnte die entsprechende Menge an TEL aus der zuvor hergestellten Stammlösung hinzu pipettiert werden. Um das entstandene Lipidgemisch zu trocknen und einen gleichmäßigen Lipidfilm zu erhalten, eignete sich wiederum der Rotationsverdampfer. Bei einer konstanten Temperatur von +40 °C im Wasserbad und kontinuierlich herabgesetztem Druck mittels Vakuumpumpe, entstand ein durchscheinender Lipidfilm, welcher in einem Phosphatpuffer mit pH 7,4 (PBS-Puffer 0,15 mol/L) rehydriert werden konnte. Zur Herstellung einheitlich erscheinender VPGs erfolgte im Anschluss an ein starkes Schütteln des Kolbens, eine Beschallung desselben im Ultraschallbad (Sonorex, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) für 30 Minuten bei +65 °C und maximaler Energie. Dies diente dazu, den Lipidfilm vollständig von der Glaswand zu lösen und die Lipide über ihre Phasenübergangstemperatur ( $T_c$ ) zu erhitzen, um eine Ausbildung der vesikulären Struktur und somit des Gelgerüsts zu ermöglichen. Dem Ultraschallbad folgte eine kurze Behandlung auf einem Schüttler (Inkubationsschüttler, IKA KS 4000, IKA-Werke, Staufen, Deutschland), welche für eine gute Durchmischung von PBS-Puffer und Lipiden sorgte. Nach rascher Abkühlung der Mischung auf +8 °C trat die Gelbildung innerhalb weniger Minuten ein und blieb auch nach anschließender Erwärmung auf Raumtemperatur im Falle der reinen DSPC, DSPC:TEL 80:20 sowie DSPC:TEL 70:30 Systeme erhalten. Das DSPC:TEL (50:50)-haltige VPG erschien nach

der Herstellung niedrigviskoser als seine Pendanten mit weniger Massenanteil TEL. Für die Herstellung der mit Methylblau (MB) beladenen VPGs wurde nach Erhalt des Lipidfilms dem PBS-Puffer die gewünschte Menge MB aus einer Stammlösung hinzu pipettiert. Alle mit MB hergestellten Gele behielten ihre gelierte Form bei Temperaturerhöhung auf Raumtemperatur bei. Die fertigen Wirkstoffträgersysteme wurden bis zur Durchführung weiterer Experimente bei +8 °C im Kühlschrank gelagert, wodurch ihre charakteristischen Eigenschaften erhalten blieben.



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung der Herstellung (wirkstoffhaltiger) Trägersysteme aus Tetraether- und Phospholipiden.

## **2.2. Herstellung der Wirkstoffträgersysteme aus synthetischen Bolaamphiphilen**

Die synthetischen bolaamphiphilen Moleküle Dotriacontan-1,1'-diylbis[2-(Trimethylammino)ethyl Phosphat] (PC-C32-PC) und Dotriacontan-1,1'-diylbis[2-(Dimethylammino)ethyl Phosphat] (Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE) wurden an der MLU Halle-Wittenberg (Halle, Deutschland) unter der Leitung von PD Dr. Simon Drescher synthetisiert [113] und der Philipps-Universität Marburg freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

### **2.2.1. Hydrogele**

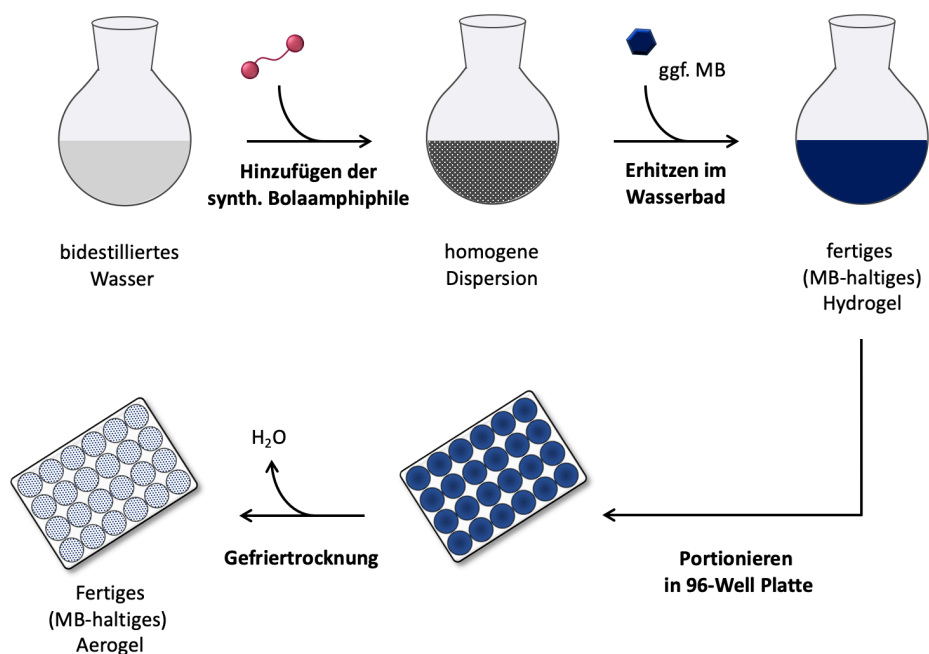
Für die Herstellung der aus PC-C32-PC bzw. Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE bestehenden Hydrogele mussten 5 mg des gewünschten Bolaamphiphils in ein Glasvial eingewogen und anschließend, unter Anwendung eines +100 °C heißen Wasserbades, in 1 mL bidestilliertem Wasser dispergiert werden. Die Gewinnung der mit MB beladenen Trägersysteme erfolgte nach identischen Arbeitsschritten. Die benötigte Menge des Wirkstoffes wurde dem bidestillierten Wasser aus einer Stammlösung hinzu pipettiert. Nach erfolgter Abkühlung auf +8 °C trat nach 48 Stunden bei allen Systemen die Gelbildung ein, welche auch bei einer Temperaturerhöhung auf Raumtemperatur erhalten blieb. Analog zu den aus DSPC und DSPC:TEL hergestellten Systemen wurden die mit synthetischen Bolaamphiphilen hergestellten Hydrogele bis zur Durchführung weiterer Experimente bei +8 °C gelagert.

### **2.2.2. Aerogele**

Die Gewinnung der Aerogele erfolgte unter Einbezug des Gefriertrockners ALPHA 1-4 LSC (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland). Ein Probenvolumen von jeweils 75 µl der in Kapitel 2.2.1 beschriebenen PC-C32-PC- und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE-haltigen Hydrogele wurden in eine Vertiefung einer 96-Well-Platte (Brand GmbH & Co. KG., Wertheim, Deutschland) pipettiert und in den Gefriertrockner eingebracht. Aufgrund des geringen Volumens der einzelnen Trägersysteme und der daraus entstehenden Gefahr des schnellen Wiederauftauens selbiger beim Transport der 96-Well Platte, musste auf ein Einfrieren vor dem eigentlichen Lyophilisationsprozesses außerhalb des Gerätes verzichtet werden. Ein An- oder Abtauen der Trägersysteme würde zum Verlust des Gelgerüsts führen, welches für die Ausbildung der Aerogel Struktur unabdinglich ist. Stattdessen wurde



ein sechsstündiges, manuelles Gefrieren unter Atmosphärendruck bei -50 °C, sowie ein gleichzeitig erfolgendes Warm-up der am Gefriertrockner angeschlossenen Vakuumpumpe, eingeleitet. Auf das Gefrieren folgte die Haupttrocknung der Hydrogele bei 0,1 mbar und -80 °C für 48 Stunden. Nach erfolgreicher Nachtrocknung für weitere sechs Stunden (+25 °C; 0,1 mbar) konnten die entstandenen Aerogele bei Atmosphärendruck und Raumtemperatur bis zur Experimentdurchführung trocken gelagert werden. Enthielten die Aerogele das lichtempfindliche MB, wurde unter Lichtausschluss gearbeitet, um einer Inaktivierung des Wirkstoffes vorzubeugen. Für die rheologischen Untersuchungen der rehydrierten Aerogele erfolgte 72 Stunden vor der Messung eine Versetzung der Aerogele mit 75 µl bidestilliertem Wasser und eine anschließende Lagerung bei +37 °C im Inkubator (NU-5840E Direct Heat inVitroCell CO<sub>2</sub>-Incubator, NuAire, Plymouth, USA), um eine komplette Hydratation zu erreichen.



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung der Herstellung (wirkstoffhaltiger) Trägersysteme aus synthetischen Bolaamphiphilen.

## **2.3. Herstellung von Hydrogelen aus Hydroxyethylcellulose 300**

Zur Vergleichbarkeit der rheologischen Eigenschaften sowie der Schleimhautverträglichkeit der in Kapitel 2.1 und 2.2 hergestellten Wirkstoff-trägersysteme mit in der pharmazeutischen Technologie konventionell genutzten Gelbildnern, fiel die Wahl auf Hydroxyethylcellulose 300 (HEC 300) (Merck, Darmstadt, Deutschland). HEC ist eines der wichtigsten handelsüblichen, löslichen Cellulosederivate und wird vielfältig in der pharmazeutischen (z. B. als Wundauflagen oder als Vaginalgele), aber auch in der kosmetischen Industrie genutzt [114]. Die hohe Wasserbindungskraft von HEC kann in Abhängigkeit des Substitutionsgrades und der Menge der eingesetzten Moleküle beeinflusst werden.

Die Herstellung des HEC 300 Hydrogels fand in Anlehnung an das im Neuen Rezeptur-Formularium (NRF) monographierte Vaginalgel statt, da die Konzentration des Gelbildners von 5 mg/mL, der der synthetischen Bolaamphiphile entsprach [115]. Für die Herstellung der 5 %igen (m/m) kolloidalen Lösung wurde frisch abgekochtes Wasser verwendet, um eine mögliche Kontamination mit Mikroorganismen auszuschließen. Nach Abkühlung des Wassers auf Raumtemperatur konnte HEC 300 unter Rühren auf die Flüssigkeitsoberfläche aufgestreut und anschließend dispergiert werden. Die zunächst noch unfertige, durch ungequollene, kleine Gelklumpen gekennzeichnete Zubereitung verblieb über Nacht zugedeckt bei Raumtemperatur. War für den nachfolgenden Versuch die Beladung des Hydrogels mit MB vorgesehen, so wurde der Wirkstoff vor dem Dispergieren der HEC 300 im abgekühlten Wasser gelöst und die Zubereitung im Dunkeln gelagert. Der über Nacht stattgefundene Verdunstungsverlust des nun vollständig zähflüssigen Hydrogels konnte mit abgekochtem Wasser ausgeglichen werden. Die Lagerung bis zur Versuchsdurchführung fand bei +8 °C im Kühlschrank statt.

## **2.4. Physikalische Charakterisierung der Wirkstoffträgersysteme**

### **2.4.1. Rotationsviskosimeter**

Unter Verwendung eines Rotationsviskosimeter (Haake™ Rotovisco 1, Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland) konnte das Fließverhalten, für die in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Trägersysteme, ermittelt werden. Genutzt wurde dabei ein Titankegel mit 20 mm Durchmesser und einem Winkel von 1° (Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland), welcher sich auf einer fixierten Platte

gleichen Durchmessers drehte. Die Messung erfolgte im „C/R ramp mode“, wobei ein definiertes Schergefälle angelegt und durch das resultierende Drehmoment die Schubspannung errechnet werden konnte. Der vom Gerät angefahrne Spalt zwischen Kegel und Platte betrug 0,54 mm. Die Temperatur verblieb während des Messvorgangs konstant bei +20 °C, um einer temperaturbedingten Änderung des Fließverhaltens vorzubeugen. Alle Messungen wurden drei Mal mit einem Probenvolumen von ca. 200 µL durchgeführt. Nach Absenkung des Kegels konnte überschüssige, an den Seiten austretende Probe vorsichtig unter Zuhilfenahme eines Papiertuches entfernt werden, um einer Manipulation der Messung von außen entgegen zu treten. Dabei war es wichtig, nicht unbeabsichtigt Probe aus dem Spalt zu entnehmen, da dies die Messung ebenfalls verfälscht hätte. Anknüpfend an die Messvorbereitung erfolgte eine zehnminütige Erholungszeit der Trägersysteme. Die so durch die Probenaufgabe einwirkende Schubspannung konnte durch diese Maßnahme keinen Einfluss auf die im Anschluss stattfindende Messung nehmen.

#### **2.4.2. Rasterelektronenmikroskopie**

Die Technik der Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurde verwendet, um die Oberflächenbeschaffenheit der nach der Gefriertrocknung vorliegenden Aerogele aus synthetischen Bolaamphiphilen (siehe Kapitel 2.2.2) zu visualisieren, sowie die inneren Morphologie der DSPC und DSPC:TEL-haltigen VPGs (siehe Kapitel 2.1.2) zu charakterisieren. Dabei war eine besonders schonende Trocknung der VPGs von Nöten, um die beim Herstellungsprozess entstandene Struktur zu erhalten, so dass analog zu der Herstellungsweise der Aerogele, ebenfalls die Gefriertrocknung geeignet erschien. Zur Vorbereitung auf die rasterelektronenmikroskopische Messung wurden alle VPGs nach abgeschlossenem Gefriertrocknungsprozess mittig geteilt und mit der Schnittfläche nach oben auf den Träger platziert. Um eine Leitfähigkeit aller zu untersuchenden Proben gewährleisten zu können, erfolge vor der Messung das Überziehen aller Wirkstoffträgersysteme mit einem dünnen Goldfilm. Dieser Vorgang vollzog sich für 60 Sekunden unter Argon Schutzatmosphäre bei einem angelegten Vakuum von  $1,3 \times 10^{-1}$  mbar und einer angelegten Spannung von 30 mA mittels Sputter Coater (Edwards S150, Edwards High Vacuum, Crawley, England). Durch diesen Prozess konnte ein verstärktes Signal der emittierenden Elektronen erzielt werden, so dass die in der Folge entstehenden Aufnahmen eine höhere Auflösung aufwiesen. Die Messungen des Rasterelektronenmikroskops (Hitachi-High Technologies Europe GmbH, Krefeld, Deutschland) entstanden unter einem Hochvakuum von  $4 \times 10^{-6}$  mbar, einer angelegten Spannung von 5 kV und 30 µA Emissionsstrom. Die so gewonnenen

Daten der Trägersysteme ließen einen möglichen Rückschluss auf die innere Struktur der hergestellten Wirkstoffträgersysteme zu.

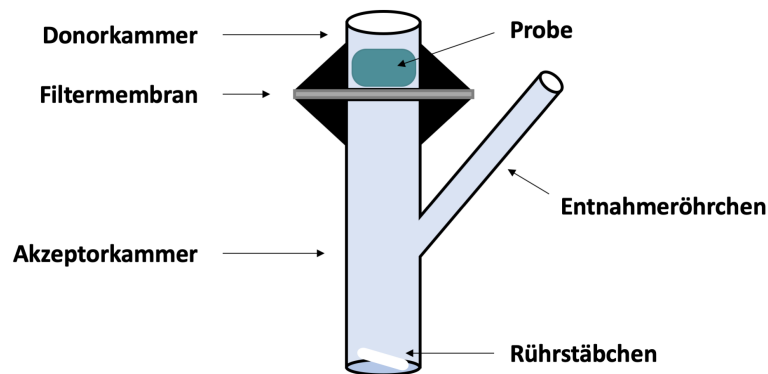
#### **2.4.3. Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie der vesikulären Phospholipid Gele aus Tetraether- und Phospholipiden**

Durch die sogenannte Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist es möglich die Größe und Morphologie der Probe *in situ* abzubilden, indem ein Elektronenstrahl die sehr dünne Probe durchdringt und die Intensität der durchgetretenen Elektronen mittels Detektors erfasst wird. Die Messung der Proben mit Hilfe des Cryo-Transmissionselektronenmikroskops Philips-CM120 (Philips GmbH, Hamburg, Deutschland) fanden am Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Halle/Saale) unter der Leitung von Dr. Gerd Hause statt. Zur Vorbereitung der Messung wurden die DSPC und DSPC:TEL-haltigen Wirkstoffträgersysteme zunächst mit PBS-Puffer auf eine Zielkonzentration von 2 mg/mL verdünnt und anschließend auf einen beschichteten Kupfergitter (Quantifoil® S7/2 Cu 400 mesh, holey carbon film grids, Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena, Deutschland) aufgebracht. Nach Entfernung der überschüssigen Probe mittels Filterpapiers folgte das Schockgefrieren durch flüssiges Ethan bei 90 K und die Überführung der Probe in die Probenkammer des Cryo-Transmissionselektronenmikroskops.

#### **2.5. Untersuchung der Freisetzung von Methylenblau aus den Wirkstoffträgersystemen**

Das Freisetzungsprofil des photodynamisch aktiven Wirkstoffes MB aus den Wirkstoffträgersystemen wurde unter Verwendung von Franz-Diffusionszellen ermittelt. Diese Methode eignete sich insbesondere deshalb, weil sie jene Freisetzungsvorgänge aus der Arzneiform nachzuahmen vermag, welche bei Luftkontakt auf der Oberseite und Flüssigkeitskontakt auf der Unterseite stattfinden. Da lediglich die Freisetzung aus der Arzneiform betrachtet werden sollte, wurde eine Membran gewählt, welche keine Diffusionsbarriere für den Wirkstoff darstellte. Die Auftragsfläche auf der 0,22 µm Filtermembran (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) betrug etwa 180 mm<sup>2</sup>. Als Akzeptormedium diente PBS-Puffer, die Temperatur der gesamten Freisetzungs-apparatur wurde mit Hilfe eines Brutschanks konstant auf +37,8 °C gehalten und aufgrund des lichtempfindlichen

Wirkstoffes unter Lichtausschluss gearbeitet. Nach erfolgreichem Aufbringen der Arzneistoffträgersysteme auf die Filtermembran, erfolgte nach definierten Zeitabständen eine Entnahme von PBS-Puffer aus dem feinen Glasröhrchen an der Seite der Akzeptorkammer (siehe Abbildung 10). Das Volumen an Akzeptormedium wurde nach jeder Probenentnahme wieder auf 12 mL aufgefüllt, um Sinkbedingungen für den Wirkstoff zu garantieren. Die in der Probe enthaltene Menge MB konnte unter Zuhilfenahme eines UV Vis Spektrometers (Multiskan™ GO, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bei einer Wellenlänge von 664 nm, anhand einer Kalibriergeraden von in PBS-Puffer gelöstem Wirkstoff, bestimmt werden. Zur Sicherstellung vergleichbarer und statistisch verwertbarer Ergebnisse, fand dieser simultan mit sechs Franz-Zellen statt.



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung einer Franz-Diffusionszelle.

Im Anschluss an den oben beschriebenen Versuch mittels Franz-Diffusionszellen, wurde die freigesetzte Menge des Wirkstoffes kumulativ gegen die Zeit aufgetragen. Eine genauere Untersuchung auf das Vorhandensein einer Übereinstimmung mit den mathematischen Modellen 0. Ordnung bzw. 1. Ordnung, des Higuchi- oder des Korsmeyer-Peppas-Modells ermöglichte es eine Aussage über jenes Freisetzungsprofil zu treffen, welches den ermittelten Daten am nächsten entsprach [116-118]. Konnte zwischen den aufgetragenen Datenpunkten eine lineare Regression gezogen werden, deren Bestimmtheitsmaß  $R^2$  oberhalb von 0,9 lag, so war eine ausreichende Übereinstimmung zwischen den Daten und dem zugrundeliegenden Modell gegeben. In Tabelle 1 sind diejenigen Parameter aufgeführt, die für die graphische Bestimmung herangezogen wurden.

Zugrundeliegendes Modell	X-Achse	Y-Achse
Kinetik 0. Ordnung	t	M <sub>ex</sub>
Kinetik 1. Ordnung	t	log (M <sub>in</sub> )
Higuchi	$\sqrt{t}$	M <sub>ex</sub>
Korsmeyer-Peppas	log (t)	log (M <sub>ex</sub> )

**Tabelle 1:** Auftragungen der X- bzw. Y-Achse zur Prüfung auf die Übereinstimmung mit den angeführten kinetischen Modellen. Die Abkürzung „ex“ bezeichnen dabei den aus der Arzneiform freigesetzten, bzw. „in“ den in der in der Arzneiform verbliebenden Wirkstoff (M) zum Zeitpunkt t.

## 2.6. In vitro Untersuchung der aPDT gegen Bakterien

### 2.6.1. Kultivierung von *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis*

Die grampositiven Kokken *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* (DSM 18669) (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) befanden sich in Müller-Hinton-Bouillon (MHB) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), welches mit 20 % Glycerol versetzt war. Sie wurden bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert. Nach Auftauen der Bakterien auf Raumtemperatur bei aseptischen Bedingungen unter der sterilen Werkbank (ScanLaf Mars, LaboGene Aps, Lyngø, Dänemark), konnten 100 µL derselben mit ca. 8 mL MHB in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt werden (Nachtkultur, NK). Im Anschluss an 24 Stunden Inkubation bei 200 rpm und +37 °C in einem Schüttler wurde die optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge (OD<sub>600</sub>) der Kultur mittels UV Mini 1240 (Shimadzu, Duisburg, Deutschland) bestimmt. Um die gewünschte OD<sub>600</sub> von 0,025 der Tageskultur (TK) in einem definierten Volumen von MHB (V<sub>MHB</sub>) zu erhalten, erfolgte die Berechnung unter Zuhilfenahme nachfolgender Formel:

$$V_{NK} = \frac{V_{MHB} * 0,025}{OD_{NK}}$$

Die erhaltene Tageskultur inkubierte bei 300rpm und +37 °C im Inkubationsschüttler bis eine OD<sub>600</sub> von 0,4 erreicht wurde, welche für die im direkten Anschluss stattfindenden Versuche notwendig war. Die erreichte OD<sub>600</sub> entsprach einer Zelldichte von 2,63x10<sup>8</sup> KBE (koloniebildenden Einheiten pro mL).

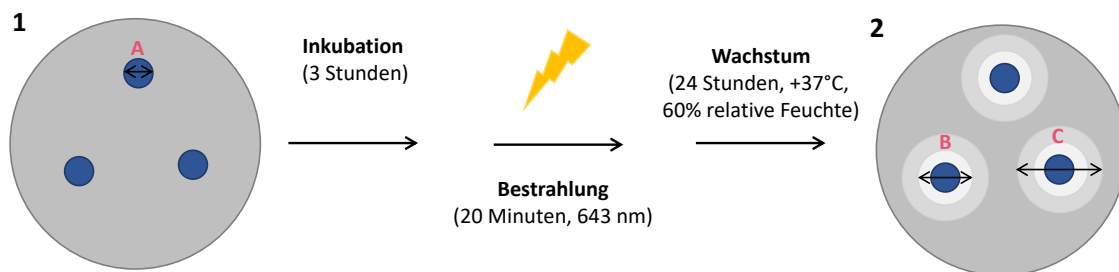
### 2.6.2. Kultivierung von *Escherichia coli*

Analog zu den grampositiven Kokken, waren die gramnegativen Bazillen *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) in MHB, welchem 20 % Glycerol zugesetzt war, bei -80 °C eingelagert. Die Herstellung der NK erfolgte unter Einbezug von 100  $\mu$ L Stammkultur bei aseptischen Bedingungen durch Nutzung der sterilen Werkbank. Nach einer Wachstumsphase über Nacht bei 200 rpm und +37 °C im Inkubationsschüttler konnte die Kultur für den nächsten Arbeitsschritte genutzt werden. Da sich in vorangegangenen Versuchen gezeigt hatte, dass die benötigte OD<sub>600</sub> für die nachfolgenden Versuche nicht erreicht werden konnte, indem die Bakterien in Suspension wuchsen, war es nötig, selbige auf ein festes Medium zu übertragen. Hierzu wurde unter Zuhilfenahme einer zuvor abgeflammt Impföse Bakteriensuspension entnommen und auf die gesamte Fläche einer Agar Platte ausgestrichen (Müller Hinton, BD GmbH, Heidelberg, Deutschland). Im Anschluss an eine weitere Inkubationszeit von 24 Stunden bei +37 °C und 60 % relativer Feuchte im Brutschrank (Heraeus GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland) war es möglich, die benötigte Menge an einzelnen Bakterienkolonien in MBH zu dispergieren, um die gewünschte OD<sub>600</sub> von 0,4 zu erreichen. Diese entsprach einer Bakterienzahl von  $2,84 \times 10^8$  KBE/mL.

### 2.6.3. aPDT gegen *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* & *Escherichia coli*

Die Wirksamkeit der aPDT an *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* (DSM 18669) und *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) konnte mittels des Agar-Diffusions-Test evaluiert werden [119, 120]. Für jedes der zu untersuchenden Wirkstoffträgersysteme wurden jeweils 100  $\mu$ L der Tageskultur auf Agar Platten pipettiert und unter Zuhilfenahme eines Drigalskispatels gleichmäßig verteilt. Im Anschluss konnten die mit MB beladenen Proben im Triplikat auf die Bakterienoberfläche aufgetragen werden. Die hohe und unterschiedliche Spreitfähigkeit der DSPC- und DSPC:TEL-haltigen VPGs würde zu einer falschen Auswertung führen. Um dies zu unterbinden wurden mit Hilfe eines an eine Vakuumpumpe angeschlossenen Saugers (Laboport® N 86 KT.18, KNF DAC GmbH, Hamburg, Deutschland) Löcher mit definiertem Durchmesser in die Agar Platte gestanzt, in denen anschließend die Wirkstoffträgersysteme appliziert werden konnten. Nach einer dreistündigen Inkubationszeit im Brutschrank bei +37 °C und 60 % relativer Feuchte fand die photodynamische Therapie mittels LED Leuchte (Lumundus GmbH, Eisenach, Deutschland) statt. Die gesamte Agar Platte wurde bei 643 nm Wellenlänge für 20 Minuten bestrahlt. Dies resultierte in einer Fluenz von 26,88 J/cm<sup>2</sup>. Am nächsten Tag erfolgte die metrische Erfassung der entstandenen

Hemm- und Eradikationshöfe mittels Messschieber. Jeder Eradikations- und Hemmhof wurde dabei dreimal an verschiedenen Stellen im Durchmesser vermessen, der Mittelwert gebildet und die Ergebnisse photographisch festgehalten. Als Kontrollgruppen dienten bestrahlte und unbestrahlte Trägersysteme ohne Wirkstoff, sowie mit und ohne äquivalenter Menge MB beladene, zuvor mit 70 %igem (v/v) Ethanol desinfizierte, Filterpapierkreise. Um eine Vergleichbarkeit der Eradikations- und Hemmhöfe zwischen den einzelnen Trägersystemen und der Referenzgruppe zu ermöglichen, wurde vom gemessenen Durchmesser der Mittelwert des individuell für die einzelnen Gruppen unterschiedlichen Probendurchmessers abgezogen. Die Versuchsdurchführung fand für jedes zu untersuchende Wirkstoffträgersystem in Tripilikaten statt.



**Abbildung 14:** Graphische Darstellung der angewandten aPDT gegen Bakterien (1 + 2), der Bestimmung des durchschnittlichen Probendurchmessers (A) und die nach 24 Stunden erfolgte Vermessung der Eradikations- (B), sowie Hemmhöfe (C) im Bakterienrasen mittels Messschieber.

#### 2.6.4. aPDT gegen *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

Der grampositive Keim *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 25923) konnte klinisch aus einem Patienten isoliert und mittels MALDI Biotyper (Bruker Corporation, Billerica, USA) bestimmt werden. Er befand sich in der Abteilung Mikrobiologie des Šumperk Krankenhauses der Tschechischen Republik in Kultur, wo dieser Versuch mit den mittels synthetischen Bolaamphiphilen hergestellten Aerogelen aus PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE freundlicherweise mit Unterstützung von Dr. Jarmila Jedelská und Jan Němec durchgeführt wurde. Zur Bestimmung der Aktivität der beladenen Wirkstoffträgersysteme konnte auch hier auf den Agardiffusionstest zurückgegriffen werden [119, 120]. Die Kolonien des isolierten Keims wurden hierzu zunächst mittels sterilen Wattestäbchen vorsichtig von der Platte entnommen und in einer sterilen 0,9 %igen NaCl Lösung suspendiert. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte. Der gewünschte Wert sollte 0,5 nicht über- oder unterschreiten. War dies der Fall, konnte entweder durch



Verdünnen oder Aufkonzentration der Suspension korrigierend eingegriffen werden. Auf die Tränkung eines neuen, sterilen Wattestäbchens folgte das Ausstreichen einer ganzen Agarplatte und das Bestücken selbiger mit jeweils drei mit MB beladenen Aerogelen auf der oberen und drei unbeladenen Wirkstoffträgersystemen auf der unteren Hälfte der Platte. Dies wurde für jedes Lipid zweimal durchgeführt. Die Platten verblieben für drei Stunden bei Raumtemperatur, bevor eine für 20 Minuten bei 643 nm Wellenlänge mittels LED Gerät bestrahlt werden konnten. Die verbliebene Agarplatte wurde 20 Minuten unbestrahlt bei Raumtemperatur belassen. Sie diente später als Kontrolle. Alle Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der abschließenden Inkubation über Nacht im Brutschrank erfolgte die metrische Erfassung, sowie die photographische Dokumentation der entstandenen Hemmhöfe im Bakterienrasen. Analog zu den vorangegangenen Versuchen wurde auch hier der Mittelwert des Probendurchmessers von jedem gemessenen Hemmhofdurchmesser abgezogen, um die Daten mit denen von *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* (DSM 18669) zu vergleichen.

## **2.7. In vitro Untersuchung der aPDT gegen Hefen**

Die fungizide Aktivität der mit MB beladenen Wirkstoffträgersysteme (siehe Kapitel 2.1 und 2.2) erfolgte unter Zuhilfenahme des Modellkeimes *Saccharomyces cerevisiae*, welcher als gepresste, frische Kultur („Blockhefe“) in einem örtlichen Supermarkt erworben werden konnte. Für den am Folgetag geplanten Agar-Diffusions-Test [119, 120] wurden frische MH-Agar Platten benötigt. Hierzu erfolgte die Einwaage von 7,6 g MH-Agar in 200 mL Wasser unter anschließender Sterilisation im Autoklaven (Truttnauer 3850 ELC, Truttnauer GmbH, Linden, Deutschland). Die noch warme Lösung wurde dem Autoklaven entnommen und in die vorbereiteten Platten gegossen. Nach erfolgtem Abkühlen auf Raumtemperatur, konnten selbige geschlossen und im Kühlschrank bei +8 °C über Kopf dunkel gelagert werden.

Für die Tageskultur erfolgte eine vorsichtige Aufschlammung von 100 mg „Blockhefe“ in 100 µL sterilem, lauwarmen Wasser. Durch Nutzung der sterilen Werkbank konnte aseptisches Arbeiten gewährleistet werden. Nach dem Pipettieren von jeweils 50 µL der Tageskultur auf die vorbereiteten Agar Platte wurde diese mit Hilfe des Drigalskispatels gleichmäßig verteilt. Darauf folgte die Platzierung der mit MB beladenen Wirkstoffträgersysteme auf den Pilzrasen. Analog zu Kapitel 2.6.3 wurden auch bei diesem Versuch Löcher unter Nutzung des an die Vakuumpumpe

angeschlossenen Saugers in die Agar Platte gestanzt, um einer Spreitung der DSPC- und DSPC:TEL-haltigen VPGs entgegen zu wirken. Der dreistündigen Inkubationszeit im Brutschrank (Heraeus GmbH & Co. KG., Hanau, Deutschland) bei 30 °C und 60 % relativer Feuchte, folgte die Bestrahlung der gesamten Platte mittels LED Leuchte bei einer Wellenlänge von 643 nm für 20 Minuten (26,88 J/cm<sup>2</sup> Fluenz). Die so behandelten Platten inkubierten anschließend für 16 Stunden im Brutschrank. Am nachfolgenden Tag konnten die entstandenen Hemm- und Eradikationshöfe, wie bereits in Kapitel 2.6.3 ausgeführt, dokumentiert und die erhaltenen Ergebnisse mit den Kontrollgruppen (bestrahlte und unbestrahlte Trägersysteme ohne Wirkstoff, sowie mit und ohne äquivalenter Menge MB beladene Filterpapierkreise) verglichen werden.

## **2.8. Ex vivo Untersuchung der Hämokompatibilität**

Die Untersuchung des potentiellen Vermögens von DSPC und DSPC:TEL-haltigen Wirkstoffträgersystemen Erythrozyten zu schädigen fand mit Hilfe des Hämolyse-Assays statt. Dazu war zunächst die Isolation von Erythrozyten aus frischem Spenderblut nötig. Um die Gerinnung zu unterbinden, folgte unmittelbar auf die Entnahme des Spenderblutes eine Zugabe von Ethylendiamintetraacetat (EDTA). Aus der Zentrifugation bei 500 g für 20 Minuten resultierte ein Pellet aus roten Blutzellen, welches dreimal mit isotonischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl, pH 7,4) gewaschen wurde. Nach einer Verdünnung der Erythrozyten mit isotonischer Kochsalzlösung (1:50 v/v) konnten die zu untersuchenden Wirkstoffträgersysteme hinzugefügt werden. Die so vorbereitete Probe inkubierte für eine Stunde bei +37 °C auf dem Schüttler in Mikrotiterplatten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit v-förmigem Boden. Im Anschluss an eine abschließende Zentrifugation, erfolgte die Bestimmung des hämolytischen Potentials schließlich durch die Messung der Absorption des Überstandes bei 540 nm in einem UV Vis Spektrometer. Als Kontrolle dienten isotonische Kochsalzlösung und 1 %ige Triton X-100® Lösung, deren Absorptionswerte mit 0 % bzw. 100 % Hämolyse gleichgesetzt wurden. Dieser Versuch konnte aufgrund des geringen Probenvolumens nicht mit den Aerogelen aus PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE durchgeführt werden.

## 2.9. Untersuchung der Verträglichkeit *in ovo*

Zur präklinischen Bewertung von neuen Wirkstoffträgersystemen werden noch immer häufig Säugetiermodelle herangezogen [121]. Jedes Jahr treten weltweit mehrere Millionen Versuchstiere ihren Einsatz für die Wissenschaft an; allein in Deutschland im Jahr 2018 etwa 2,8 Millionen Tiere, darunter vorwiegend Mäuse (etwa 75 %) gefolgt von Ratten (etwa 10 %) [122, 123]. Neben dem ethischen Anliegen, diese Zahl zu verringern, werden Tierversuche aufgrund von hohen Kosten und Zeitaufwand für Zucht und Haltung, der Erfordernis von qualifizierten und geschulten Arbeitskräften, sowie nicht zuletzt aufgrund des hohen bürokratischen Aufwands immer unattraktiver [122].

Im Sinne der 3R-Strategie (von engl. reduction, refinement, replacement) zur Reduktion, Spezifizierung und Ersatz von Tierversuchen ist die Nutzung von Hühnerembryonen eine kostengünstige, einfache und vielversprechende Alternative zu Säugetiermodellen [122]. Gegenwärtige Gesetze zur Regelung von Tierversuchen in den USA, der EU und der Schweiz erlauben das Experimentieren mit Hühnerembryonen ohne Genehmigung von Tierversuchsausschüssen, da die Experimente vor dem Schlüpfen beginnen und enden [121]. Genutzt wird bei diesen Versuchen die stark vaskularisierte, extraembryonale Chorioallantois-Membran (CAM). Die durchsichtige CAM bildet sich, beginnend mit dem dritten Tag der embryonalen Entwicklung (EDD engl. „embryo development day“), aus einer Verwachsung der embryonalen Harnblase (Allantois) mit der umgebenden äußeren Fruchthülle (Chorion). Bis EDD 10 ist diese Verwachsung komplett abgeschlossen, die entstandene CAM differenziert sich jedoch bis EDD 13 weiter und kleidet die Schale des Embryos von innen vollständig aus. Histologisch betrachtet besteht die CAM aus zwei Epithelzellschichten, die eine dünne Bindegewebsschicht begrenzen, in der sich Blut- und Lymphgefäße befinden. Bis zum Schlupf an EDD 21 dient sie dem wachsenden Küken als Atmungs- und Versorgungsorgan und versorgt es mit Sauerstoff sowie mit Calcium aus der Eierschale. Gleichzeitig fungiert sie als Reservoir für während der embryonalen Entwicklung entstehende Abbauprodukte [124].

Die Gewebezusammensetzung, die der von Schleimhäuten ähnelt, und die leichte Zugänglichkeit der CAM für experimentelle Manipulation, machen sie zu einem attraktiven präklinischen Modell für die Untersuchung von Gefäßwachstum (Angiogenese und Antiangiogenese), Wundheilung, Verträglichkeit von neuen Wirkstoffen, Materialien und Implantaten sowie von Biosensoren [122, 125]. 2006 ließ

die Food and Drug Administration (FDA) Wirkstoffträgersysteme zu, die präklinisch mit Hühnerembryonen bewertet wurden und etablierte so das Modell endgültig in der pharmazeutischen Gemeinschaft [121].

### **2.9.1. Kultivierung der Hühnerembryonen**

Die befruchteten Hühnereier wurden von Brormann GmbH (Rheda-Wiedenbrück, Deutschland) bezogen und unmittelbar nach dem Eintreffen mit 70 %igem (v/v) Ethanol desinfiziert. Die Bebrütung der Eier erfolgte bei +37,8 °C und 60-70 % relativer Feuchte in einem speziell dafür vorgesehenen Brutschrank (KMB 6, Dipl. Ing. W. Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland), welcher mit einer automatischen Wendevorrichtung ausgestattet ist. Das automatische Wenden bis zum EDD 4 ist besonders wichtig, um das Anwachsen des Embryos an die Eierschale zu unterbinden. An EDD 4 konnten die Eier geöffnet und die sich entwickelnde CAM freigelegt werden. Nach erneutem Desinfizieren der Eierschale mit 70 %igem (v/v) Ethanol wurde das stumpfe Ende der Eierschale mit Hilfe eines an Druckluft angeschlossenen EggPunch (Schuett-Biotec GmbH, Göttingen, Deutschland) perforiert. Unter Anwendung eines sterilen Skalpells erfolgte das Entfernen der Eierschale entlang der Bruchstelle. Die nun freiliegende Eihaut musste mit einer mit 70 %igem (v/v) Ethanol desinfizierten Pinzette sorgfältig entfernt werden, da diese die Sicht auf die darunter heranwachsende CAM für die nachfolgenden Experimente blockieren würde. Nach erfolgreicher Öffnung folgte die Abdeckung des etwa 3 cm großen Loches mit einer sterilen Petrischale, um Kontamination und Austrocknung zu vermeiden. Die so präparierten Eier wurden aufrecht in den Brutschrank eingelagert und bei gleichbleibenden Bedingungen bis zum Versuchsbeginn bebrütet. Die Kontrolle der Vitalität aller Embryonen erfolgte täglich; waren Embryonen abgestorben, so wurden sie unverzüglich aus dem Brutschrank entfernt und dem Versuchsablauf entnommen.

### **2.9.2. Schleimhautverträglichkeit der Wirkstoffträgersysteme**

Ein Hinweis auf die Schleimhautverträglichkeit der Wirkstoffträgersysteme gibt der sogenannte „henn’s egg test on the chorioallantoic membrane“ (HET-CAM) [126-128]. Bei diesem Verfahren werden 300 µL der zu untersuchenden Substanz auf die zehn Tage alte CAM aufgebracht, das erstmalige Auftreten in Sekunden (s) von Hämorrhagien, Gefäßlysis oder Thromben für fünf Minuten beobachtet und anschließend mit Hilfe der nachfolgenden Formel der Reizwert (IS, engl. „Irritation

Score“) berechnet [129]. Die Höhe des IS korreliert mit der Stärke der getesteten Substanz Schleimhäute zu reizen bzw. zu schädigen.

$$IS = \left[ \left( \frac{301s - s_{\text{Hämorrhagie}}}{300s} \right) * 9 \right] + \left[ \left( \frac{301s - s_{\text{Gefäßlysis}}}{300s} \right) * 7 \right] + \left[ \left( \frac{301s - s_{\text{Thromben}}}{300s} \right) * 5 \right]$$

An EDD 10 wurden, entsprechend der Versuchsvorgabe, 300 µL der entweder aus natürlichen oder aus synthetischen Bolaamphiphilen hergestellten Wirkstoffträgersysteme, des HEC 300 Hydrogels, einer 1 %igen (m/m) sodium dodecylsulfat (SDS) Lösung (Positivkontrolle) sowie 300 µL des PBS-Puffers bzw. der physiologischen Kochsalzlösung (Negativkontrolle) auf die CAM aufgebracht und die Reaktionen unter dem Stereomikroskop Stemi 2000-C (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland) bei 13-facher Vergrößerung beobachtet. Simultan zur Erfassung der Zeit bis zum ersten Auftreten der o. g. Parameter erfolgte die photographische Dokumentation, sowohl vor als auch minütlich nach dem Kontakt mit der Substanz, unter Nutzung einer an das Stereomikroskop angeschlossenen Digitalkamera (Moticam 5 CMOS, Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland). Die Bilder konnten im Anschluss mit Hilfe einer Analyse-Software (Motic Image Plus 2.0, Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland) ausgewertet werden.

Für jede der zu untersuchenden Proben wurde das Experiment sechsmal wiederholt und das Ergebnis mit den in der Literatur beschriebenen Kriterien bewertet (Tabelle 2).

<b>IS</b>	<b>Effekt auf die Schleimhaut</b>
0 – 0,9	praktisch nicht reizend
1 – 4,9	leicht reizend
5 – 8,9	moderat reizend
9 – 21	stark reizend

**Tabelle 2:** Klassifizierung der Schleimhautverträglichkeit nach N. P. Luepke [126].

Zusätzlich zur erläuterten Versuchsdurchführung, fand eine Adaption des Verfahrens für die undurchsichtigen VPGs aus DSPC und DSPC:TEL statt. Zusätzlich zur Beobachtung der Reaktion auf die Gefäße der CAM innerhalb der gesetzten Zeit von fünf Minuten, wurden die halbfesten Zubereitungen anschließend zweimal mit jeweils

einem Milliliter physiologischer Kochsalzlösung von der CAM abgespült, um die Auswirkung auf die Blutgefäße unmittelbar unter dem Wirkstoffträgersystem zu evaluieren.

### **2.9.3. Langzeitverträglichkeit der Aerogele**

In Anlehnung an das 2006 von Domenico Ribatti veröffentlichte Protocol der Versuchsdurchführung eines Experimentes zur Bestimmung der Fähigkeit von auf der CAM Oberfläche aufgetragenen Substanzen neue Blutgefäße zu bilden [130], war es durch Anpassung der Versuchsparameter ebenfalls möglich eine Aussage über die Langzeitverträglichkeit der mit den synthetischen Bolaamphiphilen PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE hergestellten Aerogele auf Schleimhäuten zu treffen. An EDD 9 wurden auf jeweils fünf Eiern PC-C32-PC- oder Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE-haltige Aerogele mit Hilfe einer Pinzette sehr vorsichtig auf die CAM Oberfläche aufgebracht, ohne die Gefäße dabei zu verletzen. Die Oberflächenbeschaffenheit, das Gefäßwachstum und der Gesundheitszustand des Embryos wurden täglich bis einschließlich EDD 14 unter dem Stereomikroskop bei 13-facher Vergrößerung kontrolliert, sowie photographisch dokumentiert.

### **2.9.4. Verträglichkeit der photodynamischen Therapie**

Die photodynamische Therapie (PDT) ist, bedingt durch die Entstehung von radikalen Sauerstoffspezies (ROS), eine unselektive Therapie [15]. Ein möglicher Schaden der umliegenden Zellen und Blutgefäße ist daher wahrscheinlich. Um die Verträglichkeit der PDT unter Nutzung der lipidhaltigen Wirkstoffträgersysteme gegen die Wirkstoff-Lösung zu untersuchen, konnte auch hier auf das CAM Modell zurückgegriffen werden.

An EDD 12 wurden für alle zu untersuchenden Trägersysteme (siehe Tabelle 3) jeweils drei Eier für den Versuch herangezogen. Vor Versuchsbeginn fand eine Überprüfung des Gesundheitszustandes jedes Embryos und der CAM statt. Nur Embryonen mit einem kräftigen, regelmäßigen Herzschlag und mit einer gut durchbluteten und durchsichtig erscheinenden CAM nahmen am Versuch teil. Die aus DSPC und DSPC:TEL hergestellten VPGs, die Aerogele aus PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE, sowie sowie eine MB-Lösung mit äquivalenter Menge Wirkstoff konnten ohne Beschädigung der Blutgefäße auf die CAM aufgebracht werden. Der gute Sitz der Probe wurde unter dem Stereomikroskop bei 13-facher Vergrößerung geprüft und

photographisch dokumentiert. Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden im Brutschrank (+37,8 °C; 60-70 % relative Feuchte) erfolgte zunächst die Beurteilung und Dokumentation des Zustandes der Proben und der umliegenden Gefäße mittels Stereomikroskop bei 13-facher Vergrößerung. War der Befund unauffällig, konnte die gesamte Oberfläche der CAM mittels LED Leuchte mit 26,88 J/cm<sup>2</sup> Fluenz (analog zu den in Kapiteln 2.6 und 2.7 stattfindenden Untersuchungen der aPDT auf Mikroorganismen) bestrahlt werden. Sowohl direkt im Anschluss an die Bestrahlung als auch nach 10, 20, 40 und 60 Minuten wurde der Zustand der CAM unter dem Stereomikroskop festgehalten. Eine letzte Dokumentation fand 24 Stunden und 48 Stunden nach der Versuchsdurchführung statt.

Lipid	Probe	ohne Bestrahlung	mit Bestrahlung
DSPC	Hydrogel	✓	✓
	Hydrogel mit Methylenblau	✓	✓
DSPC:TEL (80:20)	Hydrogel	✓	✓
	Hydrogel mit Methylenblau	✓	✓
DSPC:TEL (70:30)	Hydrogel	✓	✓
	Hydrogel mit Methylenblau	✓	✓
DSPC:TEL (50:50)	Hydrogel	✓	✓
	Hydrogel mit Methylenblau	✓	✓
PC-C32-PC	Hydrogel	n. b.	n. b.
	Hydrogel mit Methylenblau	n. b.	n. b.
	Aerogel	✓	✓
	Aerogel mit Methylenblau	✓	✓
Me <sub>2</sub> PE-C32-Me <sub>2</sub> PE	Hydrogel	n. b.	n. b.
	Hydrogel mit Methylenblau	n. b.	n. b.
	Aerogel	✓	✓
	Aerogel mit Methylenblau	✓	✓
Kontrolle	kein Trägersystem	n. b.	✓
	Methylenblau-Lösung	✓	✓

**Tabelle 3:** Übersicht über die in 2.9.4 verwendeten Wirkstoffträgersysteme, nicht durchgeführte Versuche sind mit n. b. (*nicht bestimmt*) bezeichnet.

### **3. Herstellung und Charakterisierung der Wirkstoffträgersysteme – Ergebnisse und Diskussion**

#### **3.1. Wirkstoffträgersysteme aus natürlichen Bolaamphiphilen**

##### **3.1.1. Gewinnung der Tetraetherlipide aus *Sulfolobus acidocaldarius***

Für die Isolierung der Tetraetherlipide (TEL) aus der gefriergetrockneten Biomasse des Organismus *Sulfolobus acidocaldarius* kann auf verschiedene Methoden und Protokolle zurückgegriffen werden [131]. Das verbreitetste Protokoll geht auf das Verfahren von Bligh & Dyer zurück, welches in der Industrie für die Isolierung von Membranlipiden mittels  $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$  aus biologischen Materialien genutzt wird [132]. Durch die Erhöhung des MeOH-Anteils des  $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ -Gemisches (2:1) wird die Polarität des Extraktionsmittels gesteigert was in der Folge zu einer gleichzeitigen Steigerung der Ausbeute führt. Dennoch ist mit etwa 4 % die Ausbeute der PLFE aus der gefriergetrockneten Biomasse von *Sulfolobus acidocaldarius* sehr gering [85]. Da für die Entwicklung der in der vorliegenden Arbeit hergestellten VPGs große Massen Lipid benötigt werden, die Kultivierung des Organismus nicht möglich war und die PLFE etwa 70% der gesamten Membranlipide darstellt [79, 80], wurde für die nachfolgenden Versuche auf eine weitere Aufreinigung des extrahierten Gesamtlipidextraktes (GLE) verzichtet.

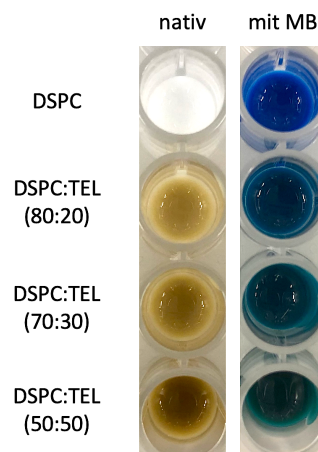
Die Extraktion unter Anwendung der Soxhlet-Apparatur bietet im Gegensatz zu der von Bligh & Dyer genutzten konventionellen Extraktion unter Rückfluss zusätzlich den Vorteil, dass wesentlich weniger Lösungsmittel verwendet werden muss, um die gleiche Masse an Lipiden zu extrahieren [131]. Die Extraktionsmethode mittels Soxhlet-Apparatur war bereits am Institut etabliert, konnte aber in der vorliegenden Arbeit keine Anwendung finden [100]. Da sich während des Extraktionsvorganges Cellulosefasern aus der Extraktionshülse lösten, die sich durch die fehlende Aufreinigung des Extraktes im Anschluss an die Gewinnung nicht wieder aus der Stammlösung entfernen ließen, bildeten sich in der Folge Aggregate aus, die die Versuchsdurchführung behinderten. Als Reaktion auf diese Ereignisse fand daher die Gewinnung des GLE wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben mittels konventioneller Extraktion unter Rückfluss statt. Die Membran von Thermoacidophilen wie *Sulfolobus acidocaldarius* besteht zu etwa 10 % aus Lipiden [79]. Bei der vorliegenden Einwaage von 6,5 g gefriergetrockneter Biomasse, entsprechen die im Mittel gewonnen 391,8 mg etwa einer 60 %igen Lipidausbeute des in der Gesamtmasse enthaltenen Lipids.



Der erhaltene GLE besteht aus einer Mischung verschiedener Lipide, darunter die für die Herstellung der VPGs benötigten TEL, mit unterschiedlichen Kopfgruppen [77, 79, 80]. Durch den Verzicht auf den Zusatz von Säuren, wie beispielsweise Salzsäure, liegen die Kopfgruppenstrukturen unverändert vor [85, 131]. Weiterhin enthalten sind Verunreinigungen, wie beispielsweise Pigmente wodurch der GLE tiefbraun gefärbt erscheint und einen charakteristisch „würzigen Geruch“ aufweist. In Abbildung 12 ist die Trennung des gewonnenen GLE mittels Dünnschichtchromatographie (DC) dargestellt. Als mobile Phase eignete sich eine Mischung aus  $\text{CHCl}_3$ :MeOH:H<sub>2</sub>O (70/26/4 v/v/v) [81, 85]. Die Trennung auf der stationären Phase (Kieselgel) ergab dabei 8 Spots auf einer Laufstrecke von 10 cm, die auf ein heterogenes Gemisch hinweisen. Diese wurden anhand der im Anschluss stattfindenden Behandlung mit einem Sprühreagenz aus H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:MeOH (50:50 v/v) und anschließender Erhitzung auf 160 °C als unterschiedlich intensiv gefärbte bräunlich-rote Flecken sichtbar. Anhand der Intensität der Färbung lassen sich Rückschlüsse auf die Massenverhältnisse innerhalb des Gemisches schließen. Stärker gefärbte Spots weisen dabei auf eine höhere Konzentration im Gemisch hin, während schwächer gefärbte Spots oft Nebenprodukte darstellen [133]. Mittels der errechneten R<sub>F</sub>-Werte konnten die erscheinenden Spots zugeordnet werden: Shi-Lung Lo und E. L. Chang ermittelten 1990 mit annähernd der gleichen Fließmittelzusammensetzung aus  $\text{CHCl}_3$ :MeOH:H<sub>2</sub>O für die TEL GDNT und GDGD (Strukturformeln der TEL siehe Abbildung 6, Seite 20) R<sub>F</sub>-Werte von 0,7 für GDNT und 0,12 für GDGD [81]. Diese Werte stimmen mit zwei der am stärksten gefärbten Spots überein (siehe Abbildung 15). Die Trennung der Lipide erfolgt dabei aufgrund ihrer relativen Polarität, die hauptsächlich durch die Kopfgruppen beeinflusst wird [131]. Die neben den GDNT und GDGT auftretenden Spots stellen die weiteren Lipide des GLE, sowie Nebenprodukte und Verunreinigungen dar, die in der Folge nicht weiter charakterisiert wurden.



**Abbildung 15:** Analyse der TEL-haltigen Extrakte beider Extraktionen mittels Dünnschichtchromatographie.  $\text{HCl}_3\text{:MeOH:H}_2\text{O}$  (70/26/4 v/v/v) als mobile und Kieselgel als stationäre Phase.



**Abbildung 16:** Makroskopisches Bild der aus DSPC mit unterschiedlichen Massenanteilen TEL hergestellten Wirkstoffträgersystemen mit und ohne Methylenblau (MB).

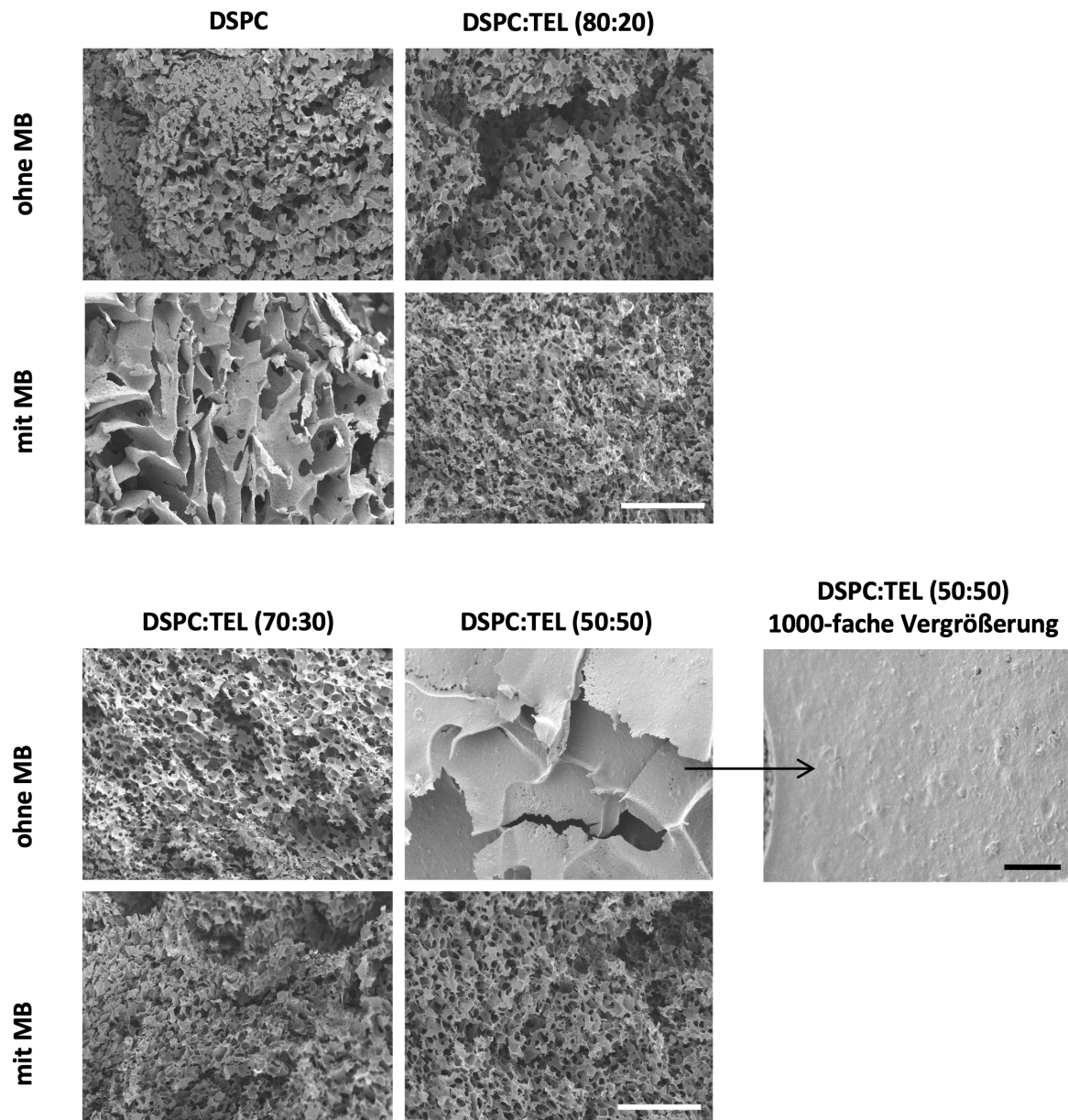
### 3.1.2. Herstellung der vesikulären Phospholipid Gele aus Tetraether- und Phospholipiden

Wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, konnte für die Herstellung der Wirkstoffträgersysteme auf die Filmbildungs-Rehydratations-Methode zurückgegriffen werden [98, 112]. Alle Zusammensetzungen aus dem Phospholipid 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin (DSPC) und zugesetzten TEL (DSPC:TEL) bildeten einheitlich erscheinende, gleichmäßige Filme an der Glaswand des Rundkolbens aus, was für eine gute Mischbarkeit beider Lipide spricht. Durch Zugabe des PBS-Puffers erfolgte die Hydratisierung des Lipidfilmes unter der Bildung von VPGs [112]. In Abhängigkeit der zugesetzten Menge an TEL, verschob sich die Färbung der Wirkstoffträgersysteme ins gelblich-bräunliche, bzw. bei Zugabe von Methylenblau (MB) ins bläulich-grünliche (siehe Abbildung 16). Anders als bei den gewählten DSPC:TEL Massenverhältnissen von 80:20 (m/m), 70:30 (m/m) und 50:50 (m/m) war die Herstellung von Wirkstoffträgersystemen die nur aus dem GLE bestanden nicht möglich, da nach der Zugabe des PBS-Puffers zum Lipidfilm kein stabiler Zustand des Gemisches erreicht werden konnte. Dieser Umstand ist auf die Verwendung des GLE im Gegensatz zur reinen TEL-haltigen PLFE (mit 90 % GDNT und 10 % GDGT) zurückzuführen. Der GLE besteht neben weniger polaren (etwa 10 %) und neutralen (etwa 20 %) Lipiden lediglich zu 70% aus den in der PLFE enthaltenen TEL, deren Fähigkeit der spontanen Bildung von multilamellaren Vesikel Shi-Lung Lo und E. L. Chang 1990 nachgewiesen haben [79-81].

### **3.1.3. Charakterisierung der Wirkstoffträgersysteme**

#### **3.1.3.1. Rasterelektronenmikroskopie**

Im Anschluss an die erfolgreiche Herstellung der DSPC- und DSPC:TEL-haltigen Wirkstoffträgersysteme erfolgte die Charakterisierung zunächst unter Zuhilfenahme des Rasterelektronenmikroskops wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen erlauben es die Oberflächenstrukturen der Probe zu visualisieren. Um die innere Morphologie der erhaltenen Wirkstoffträgersysteme darzustellen, wurden sie nach erfolgreicher und schonender Gefriertrocknung vorsichtig mittig geteilt und mit der Bruchkante nach oben auf den Träger aufgebracht. Im Anschluss an die dünne Goldbefilmung fanden die Aufnahmen in der Probenkammer des Mikroskops statt, die in Abbildung 17 dargestellt sind. Durch die Sublimation der inneren Phase (PBS-Puffer pH 7,4), sind nur noch die durch die Lipide gebildeten Strukturen sichtbar. Die Beschaffenheit der mit DSPC, DSPC:TEL (80:20) und DSPC:TEL (70:30) hergestellten Trägersysteme ohne eingeschlossenen Wirkstoff zeigen kaum Unterschiede in ihrer Morphologie und die erhaltenen Strukturen sind mit denen von gefriergetrockneten Hydrogelen vergleichbar [134-137]. Vergleicht man jedoch das durch eine feine Porung charakterisierte Erscheinungsbild dieser Systeme mit jenem aus DSPC:TEL (50:50), so sind bei gleicher mikroskopischer Vergrößerung große Unterschiede hinsichtlich der inneren Struktur erkennbar. Unter dem REM erscheint das Innere der gefriergetrockneten DSPC:TEL (50:50)-haltigen VPGs mehr lamellenartig als porös aufgebaut zu sein.



**Abbildung 17:** Rasterkraftelektronenmikroskopische Aufnahmen der gefriergetrockneten, aus DSPC und DSPC:TEL mit verschiedenen Massenanteilen TEL, hergestellten VPGs sowohl mit als auch ohne eingearbeitetem Methylenblau (MB) bei 200- und 1000-facher Vergrößerung. Die Maßstabsbalken entsprechen 200 µm (weiß; 200-fache Vergrößerung), bzw. 30 µm (schwarz; 1000-fache Vergrößerung).

Es kann angenommen werden, dass bei der Herstellung von den Wirkstoffträgersystemen aus reinem DSPC eine heterogene Struktur aus uni- und multilamellaren Vesikeln (vgl. Abbildung 8 Seite 25) unterschiedlicher Größe entstanden sind, was sowohl mit der Literatur als auch mit dem dargestellten Querschnitt durch das Trägersystem korreliert [97, 98]. Das entstandene Gel wird dabei sowohl durch die sterische Abschirmung der einzelnen Vesikel untereinander als auch durch die Vielzahl von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den

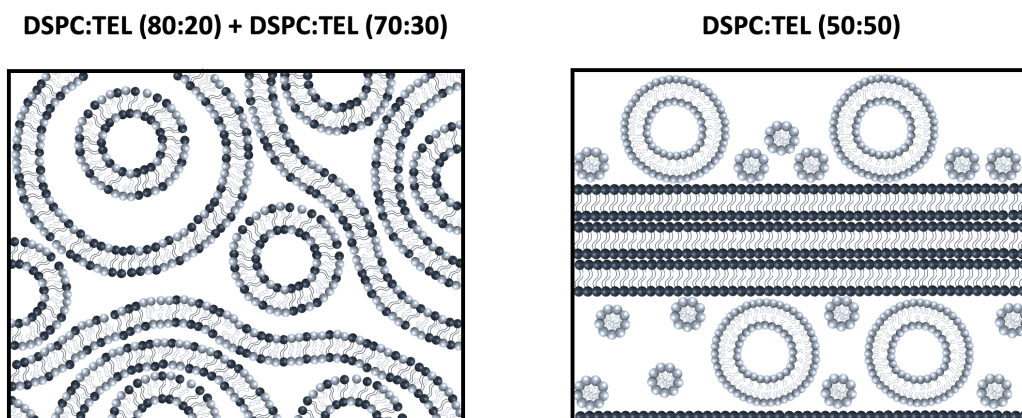
Kopfgruppen der Lipide stabilisiert. Eine Arbeit aus dem Jahr 2015 konnte dokumentieren, dass die Wahl des Wirkstoffes großen Einfluss auf die Morphologie von VPGs nehmen kann [138]. Durch den Einschluss des hydrophilen, geladenen Wirkstoffes MB innerhalb der Vesikel und in die Vesikelzwischenräume ist das Vermögen Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden angestiegen, was in einer Erhöhung der Stabilität des Systems resultiert (vgl. Kapitel 3.1.3.3). Ebenfalls wird angenommen, dass MB die Morphologie der Vesikel innerhalb des Wirkstoffträgersystems beeinflusst, was in Abbildung 17 anhand der größeren Zwischenräume des Lipidgerüsts des DSPC-haltigen VPG mit eingearbeitetem Wirkstoff erkennbar ist.

Alessandra Gliozzi *et al.* berichteten 2002 über einen Anstieg der Vesikelgröße mit zunehmenden Anteilen an zugesetzten TEL [78]. Die Messungen fanden dabei bei geringen Lipid-Gesamtkonzentrationen im wässrigen Medium statt. Die Wirkstoffträgersysteme aus DSPC:TEL (80:20) und DSPC:TEL (70:30) zeigen sowohl ohne als auch mit eingeschlossenem Wirkstoff jedoch keine Unterschiede in der Struktur des VPG-Gerüsts, was vermutlich in den hohen Konzentrationen der Lipide begründet liegt. Die strukturelle Ähnlichkeit zu den DSPC-Systemen lässt vermuten, dass sich die Struktur ebenfalls aus Vesikeln unterschiedlicher Größe zusammensetzt. Das Fehlen eines strukturellen Unterschiedes zwischen den Wirkstoffträgersystemen mit eingeschlossenem MB und den unbeladenen Systemen könnte wiederum an der Struktur der TEL selbst liegen. Sowohl GDNT als auch GDGT tragen an ihren Kopfgruppen große Zuckerreste, die aus den Vesikeln herausstehen und die im Vergleich zu dem an der DSPC-Kopfgruppe befindlichen Phosphatidylcholin-Rest ein größeres räumliches Volumen einnehmen. Aufgrund dessen kann das verhältnismäßig kleine MB-Molekül nicht auf die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Zuckern einwirken, so dass die Wirkung der zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen hier weniger stark ins Gewicht fällt, als bei den reinen DSPC-Systemen.

Anders sieht es aus, wenn man sich das Trägersystem aus DSPC:TEL (50:50) betrachtet. In Abbildung 17 ist, vergleichend mit den anderen Trägersystemen, eine deutlich andere Struktur des DSPC:TEL (50:50) Lipidgerüsts erkennbar. Es ist anzunehmen, dass bei dieser Konzentration zwischen DSPC und den Lipiden des GLE eine Phasenseparation des Systems vorherrscht. Dies hat sowohl auf die Stabilität (siehe Kapitel 3.1.3.3) als auch auf die Morphologie des VPG Auswirkungen. Es ist bekannt, dass TEL neben den im wässrigen Medium berichteten Vesikelformationen,

auch Platten sog. „rafts“ (von engl. „Flöße“) ausbilden kann, die aus planaren Monoschichten der TEL bestehen (vgl. Abbildung 8 Seite 25) [88]. Aufgrund des hohen Lipidanteils in den Wirkstoffträgersystemen sind die TEL-rafts besonders groß und weisen einen dickeren Querschnitt als die nur etwa 3,8 nm dicke TEL-Monoschicht auf [87], so dass davon auszugehen ist, dass mehrere Lamellenstapel an der Bildung beteiligt sind. Die selbstorganisierten supramolekularen Strukturen aus den DSPC Phospholipiden, wie beispielsweise Liposomen, sind verhältnismäßig klein. In der 1000-fachen Vergrößerung der DSPC:TEL (50:50) Trägersysteme sind kleinere Erhebungen auf den Platten zu erkennen, die auf oben auf den TEL-rafts anhaftende DSPC-Strukturen schließen lassen. Durch die Zugabe von MB ändern sich die Morphologie und Stabilität des Systems dramatisch. Wie bereits bei den anderen VPGs kommt hier die vermehrte Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zum Tragen, so dass die molekulare Anordnung zu Vesikeln für die beiden Lipide energetisch begünstigt zu sein scheint. Die rasterelektronenmikroskopischen Bilder aller DSPC:TEL-haltigen Wirkstoffträgersysteme erscheinen einheitlich strukturiert, so dass eine ähnliche Größe der Vesikel aus DSPC:TEL (50:50) verglichen mit den Strukturen des mit DSPC:TEL (80:20) und DSPC:TEL (70:30) hergestellten Gelen angenommen werden kann.

Bisher sind keine vesikulären Gele aus Phospholipiden und TEL aus der Literatur bekannt, daher ist die innere Struktur dieser Systeme noch immer Gegenstand der Forschung. In Abbildung 18 ist auf Basis der durch das Verfahren der Rasterelektronenmikroskopie gewonnen Erkenntnisse schematisch dargestellt, wie die innere Struktur dieser Wirkstoffträgersysteme aussehen könnte.



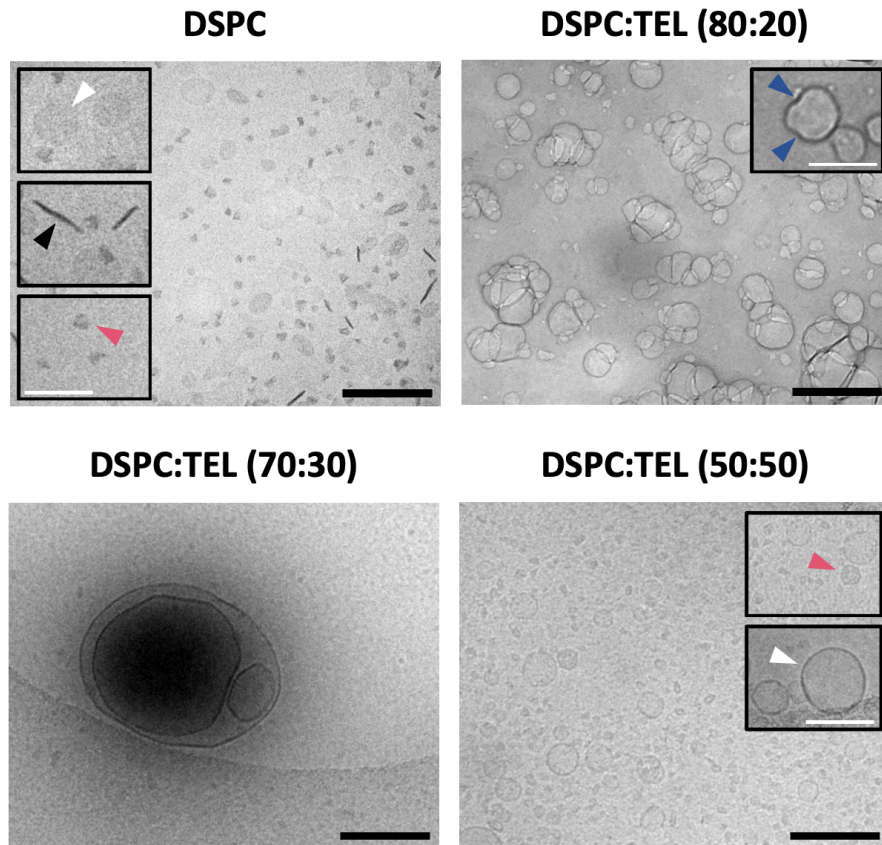
**Abbildung 18:** Schematische Darstellung der, auf der Basis von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen angenommenen, inneren Struktur der mit verschiedenen Massenanteilen TEL hergestellten Wirkstoffträgersystemen.

### 3.1.3.2. Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie

Um die in Kapitel 3.1.3.1 aufgestellte Hypothese der aus DSPC und verschiedenen Massenanteilen DSPC:TEL erhaltenen Strukturen der Wirkstoffträgersysteme weiter zu festigen, wurde sich der Technik der cryo-Transmissionselektronenmikroskopie (cryo-TEM) bedient. Mit Hilfe der cryo-TEM lassen sich Größe, Lamellarität und Morphologie der Formulierungen betrachten. Da das Messprinzip auf der Erfassung eines durch die Probe tretenden Elektronenstrahls beruht, sind große Lipidkonzentrationen nicht zur Visualisierung geeignet. Daher wurden die Proben vor der Messung mit PBS-Puffer auf eine Konzentration von 2 mg/mL verdünnt und im Ultraschallbad für 15 Minuten bei 65 °C beschallt. Resultierend aus dieser Versuchsdurchführung entspricht die in Abbildung 19 dargestellte Morphologie der Probe nicht die der eigentlichen Wirkstoffträgersysteme, sondern der aus der Verdünnung heraus entstandener Lipidaggregate. Dennoch können mit Hilfe der cryo-TEM-Messung Rückschlüsse auf die ursprünglichen Trägersysteme geschlossen werden. Folgt man der Annahme, dass bei einem Massenverhältnis von DSPC zu den Lipiden des GLE von 50:50 (m/m) eine Phasenseparation vorliegt, so müsste die Verdünnung der DSPC:TEL (50:50) im Verhältnis zu den verdünnten Systemen aus DSPC:TEL (80:20) und DSPC:TEL (70:30) mehr mizellare und weniger liposomale Strukturen aufweisen, da beide Lipidfraktionen getrennt voneinander im wässrigen die für sie typischen Strukturen bilden. Liegen beide Lipidfraktionen gemischt vor, so müsste, bedingt durch die stabilisierenden Eigenschaften der TEL, die Bildung von Liposomen begünstigt werden [78].

Die cryo-TEM Aufnahmen der DSPC-haltigen Probe zeigen unterschiedliche Strukturen. Durch die Behandlung im Ultraschallbad ist die Entstehung von Mizellen (rosa Dreiecke) und unilamellaren Liposomen (weiße Dreiecke) gegenüber von multilamellaren bevorzugt [139]. Die Literatur wird durch die cryo-TEM-Aufnahmen der DSPC Strukturen gestützt, in der neben wenigen unilamellaren Vesikeln vor allem sehr kleine Mizellen das Bild beherrschen [139]. Ebenfalls vorhanden sind Anordnungen der DSPC-Moleküle zu planaren Scheiben, den sog. „discs“, die in Abbildung 16 in Seitenansicht gut zu sehen sind (schwarzes Dreieck) [134, 140].





**Abbildung 19:** Cryo-Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der auf 2 mg/mL verdünnten Wirkstoffträgersysteme aus DSPC und DSPC:TEL mit variierenden Anteilen TEL, ohne enthaltenen Wirkstoff. Die Dreiecke markieren spezifische Strukturen; weiß – Vesikel, schwarz – Lipid-discs in Seitenansicht, rosa – Mizellen, blau – Einbuchtungen in Vesikeln. Der schwarze Maßstabsbalken entspricht 200 nm, der weiße 100 nm.

Mit wachsendem Anteil an TEL ändern sich die Strukturen. Die verdünnten Proben des DSPC:TEL (80:20)-haltigen VPG zeigen zusammengeklebte Vesikel unterschiedlicher Größe, wobei kleinere Vesikel unter 100  $\mu\text{m}$  dabei vorherrschend sind. Kleine mizellare Strukturen, wie bei den Trägersystemen aus DSPC, konnten nicht gefunden werden. Die im Vergleich zu den DSPC-Strukturen dicker werdende Wand der Vesikel deutet auf Multilamellarität hin [141, 142]. Interessant zu beobachten war außerdem, dass die gebildeten DSPC:TEL Vesikel nicht einheitlich sphärisch waren. An einigen wenigen Vesikeln sind kleine Einbuchtungen sichtbar (blaue Dreiecke), die auf eine dort vorliegende erhöhte Rigidität hindeuten können, die mit den TEL in der Membran in Zusammenhang stehen [143]. Im Gegensatz dazu waren die Proben aus DSPC:TEL (70:30) relativ einheitlich in ihrer Morphologie. Das Trägersystem bildete nach der Verdünnung auf 2 mg/mL relativ große multilamellare Vesikel von bis zu 500  $\mu\text{m}$  aus, in denen sich häufig noch weitere Strukturen befanden. Ähnlich wie bei der Probe mit DSPC:TEL (80:20) waren auch hier die Vesikel nicht einheitlich sphärisch. Weiterhin waren keine Mizellen anzutreffen, was die in



Kapitel 3.1.3.1 aufgestellte Hypothese der inneren Struktur der Wirkstoff-trägersysteme stützt. Ebenfalls stützen die bei der cryo-TEM gewonnenen Erkenntnisse jene die von Alessandra Gliozzi *et al.* 2002 berichtet wurden; mit steigendem Anteil TEL nahm die Größe der Vesikel zu [78].

Betrachtet man sich die Morphologie der Probe mit DSPC:TEL (50:50), so ist wiederum einen deutlichen Unterschied zu den Wirkstoffträgersystemen mit geringerem TEL-Anteil erkennbar. Zu sehen sind vor allem wenige kleinere Vesikel und viele Mizellen, die auf eine uneinheitliche Zusammensetzung hindeuten können. Eine mögliche Annahme ist, dass sich die Mizellen spontan beim Verdünnungsprozess aus den TEL-haltigen Lamellenstapeln (rafts) gebildet haben, während die wenigen vesikulären Strukturen jenen auf den rafts aufliegenden, vor der Verdünnung vorhandenen, DSPC-Vesikel entsprechen.

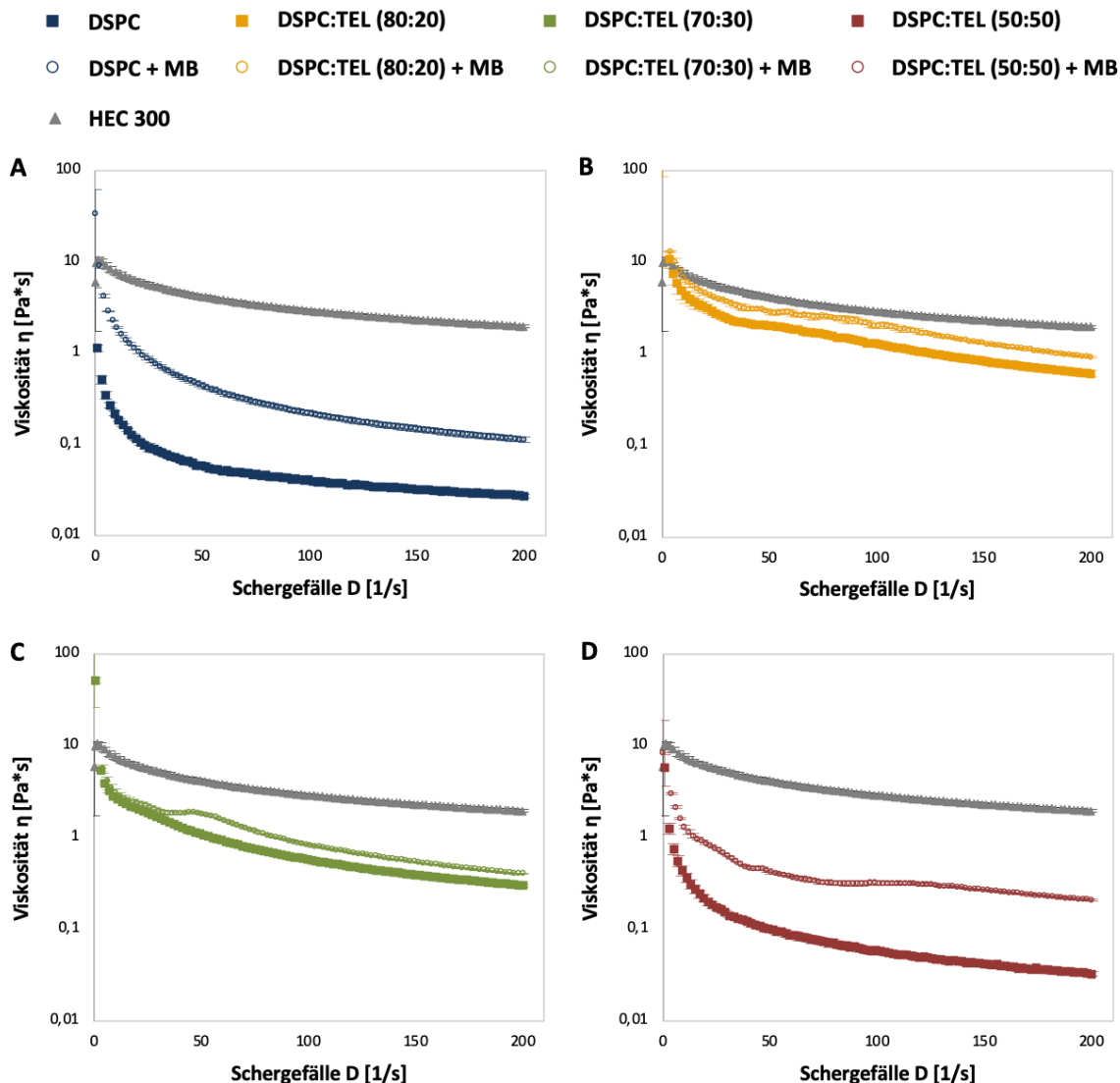
Die in dieser Arbeit vorliegenden cryo-TEM Daten stützen die Hypothese zur inneren Struktur der mit verschiedenen Massenanteilen DSPC:TEL hergestellten Trägersystemen. Für eine eindeutige Strukturaufklärung der Morphologie innerhalb der Wirkstoffträgersysteme, wäre es möglich die Technik der Gefrierbruch-elektronenmikroskopie heranzuziehen, da dort VPGs mit ihren hohen Lipid-Anteilen *in situ* abgebildet werden können, ohne sie verdünnen zu müssen und so die Originalstruktur zu beeinflussen.

### **3.1.3.3. Charakterisierung des Fließverhaltens**

Das Fließverhalten spielt bei Gelen eine entscheidende Rolle für ihre Anwendbarkeit als Wirkstoffträgersysteme. Feste Hydrogele sind aufgrund ihrer gewebeähnlichen Beschaffenheit im biomedizinischen Bereich u. a. als Implantate sehr gefragt. Flüssige Hydrogele wiederum finden in der dermalen und subkutanen (s. c.) Anwendung vielfältige Einsatzmöglichkeiten [144].

Die hohe Viskosität von VPGs gilt bisher als Nachteil dieser Systeme, da sie vor der Applikation während einer Operation oder vor der i. v. Gabe zu Liposomen verdünnt werden müssen. Zudem beeinträchtigt die hohe Viskosität die Verabreichung mit dünnen s. c. Nadeln, so dass eine geringe Compliance des Patienten und möglicherweise ungenaue Dosierung die Folge sind [98]. Eine topische Applikation auf Haut- oder Schleimhäuten umgeht nicht nur all diese Probleme, sondern die hohe Viskosität bietet gegenteilig sogar Vorteile gegenüber niedrigviskosen wirkstoff-

haltigen Lösungen [7]. Die rheologischen Eigenschaften der VPGs aus DSPC und DSPC:TEL konnten, wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben, unter Zuhilfenahme des Rotationsviskosimeters bestimmt werden. In Abbildung 20 sind die Messdaten graphisch zu sog. Rheogrammen aufgetragen.



**Abbildung 20:** Rheogramm der Wirkstoffträgersysteme aus DSPC (1) und DSPC:TEL mit variablen TEL-Anteilen (2-4) sowohl mit (leere Kreise) als auch ohne eingearbeitetem Wirkstoff Methylenblau (MB) (volle Kästchen) im Vergleich zum HEC 300 Hydrogel (volle Dreiecke).

Die Arbeitsgruppe um Gerhard Winter stellte fest, dass das rheologische Verhalten von herkömmlichen, aus reinen Phospholipiden hergestellten VPGs mit denen von Hydrogelen vergleichbar war, die mit konventionellen Gelbildnern wie beispielsweise Cellulosederivaten hergestellt wurden [98]. Daher fand eine Vergleichsmessung mit dem in Kapitel 2.3 beschriebenen Hydroxyethylcellulose 300 (HEC 300) Hydrogel

statt, welches dem aus der NRF Vorschrift 25.3 weitestgehend entsprach [115]. Sowohl bei der Herstellung als auch bei der vorangegangenen physikalischen Charakterisierung der VPGs (siehe Kapitel 3.1.3.1 und 3.1.3.2) konnten deutliche Unterschiede zwischen den Wirkstoffträgersystemen mit und ohne MB festgestellt werden, so dass die rheologische Untersuchung beider Systeme sinnvoll erscheint. Die während der Messung entstandenen Kurvenverläufe zeigen bei allen vermessenen Proben viskoelastisches Verhalten, welches mit einer Abnahme der Viskosität mit zunehmender Scherbeanspruchung einhergeht.

Scheinbar entgegen der Literaturangaben entspricht das Fließverhalten des DSPC-haltigen Wirkstoffträgersystems nicht dem des Referenzgel mit HEC 300. Dies kann verschiedene Gründe haben. Allem voran sind klassische Hydrogele hinsichtlich ihres Gelbildungsverhaltens und ihrer Gelstruktur nicht mit den VPGs vergleichbar. Die Interaktion der langen, mit Ethylenoxid veretherten Polysaccharid Fasern der HEC 300 mit den umgebenden Wassermolekülen beruht vordergründlich auf Wasserstoffbrückenbindungen. Diese können in Abhängigkeit des Substitutionsgrades des HEC-Moleküls entweder mit den Hydroxylgruppen des Ethylenoxids oder denen der  $\beta$ -D-Glucose ausgebildet werden. Die so erreichte hohe Wasserbindungskapazität führt zur erwünschten Gelbildung, anders als bei den VPGs, deren Gelbildung in der sterischen Abschirmung der Vesikel untereinander begründet liegt. Die Festigkeit des Endproduktes lässt sich bei beiden Systemen steuern. Bei HEC 300 bestimmen sowohl der Substitutionsgrad als auch die eingesetzte HEC-Konzentration die rheologischen Eigenschaften. Bei VPGs sind sowohl die Art, Zusammensetzung und Konzentration der eingesetzten Phospholipide, die Vesikelgrößenverteilung und schlussendlich auch der eingeschlossene Wirkstoff entscheidende Parameter, die das Endprodukt beeinflussen können [97, 98]. Weiterhin ist zu bemerken, dass die in dieser Arbeit verwendeten VPGs einer anderen Herstellungstechnik unterlagen als die für die Arbeit von Gerhard Winter. Die zitierte Arbeitsgruppe stellte die untersuchten DSPC-haltigen VPGs mittels Hochdruckhomogenisation her, welche in einer feinen Verteilung von einheitlich kleinen unilamellaren Vesikeln resultiert [96-98]. Geprägt durch die einheitliche und sehr kleine Größe im Vergleich zum Volumen besitzen diese Vesikel durch die vielfältige sterische Abschirmung hohe mechanische Festigkeit. In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Filmbildungs-Rehydratations-Methode zurückgegriffen, die zwar ebenfalls für die Herstellung von VPGs geeignet ist, jedoch zu einer Inhomogenität hinsichtlich der gebildeten Vesikelmorphologie führen kann [98]. Bei der angewandten Methode hydratisieren die getrockneten Phospholipide des an der Glaswand des Rundkolbens gebildeten Lipidfilms und

quellen bei Kontakt mit dem wässrigen Medium unter Bildung von Lamellenstrukturen, so bilden sich zunächst sehr große multilamellare Vesikel [112]. Unter Einwirkung der im Anschluss folgenden Ultraschallbehandlung oberhalb der Phasenübergangstemperatur ( $T_c$ ) erfolgt durch die veränderte Struktur der Phospholipide die gewünschte Abspaltung von kleineren, zumeist unilamellaren Vesikeln [139]. Diese uneinheitliche Verteilung der Vesikelmorphologie hat deutlichen Einfluss auf die Fließeigenschaften der gebildeten Trägersysteme, wie in Abbildung 20 deutlich wird. Ebenfalls erkennbar ist, dass der Wirkstoff MB zu einer Erhöhung der Viskosität des DSPC-Systems führt, was zum einen mit der Literatur, als auch mit den vorangegangenen Ergebnissen korreliert [138]. Die Viskositätserhöhung durch den Zusatz des MB erklärt sich, wie im vorangegangenen Kapitel 3.1.3.1 erläutert, in der vermehrten Möglichkeit der Wasserstoffbrückenbindungsbildung zwischen dem positiv geladenen Wirkstoff und dem negativ geladenen Phosphats im Kopfteil des DSPC-Phospholipids.

Das Fließverhalten von DSPC:TEL (80:20) und DSPC:TEL (70:30) weisen auf eine höhere mechanische Festigkeit hin, als das reine DSPC-System, dass sich zudem dem Fließverhalten des Referenzgels annähert. Auffällig ist, dass sich die Messdaten der beiden Wirkstoffträgersysteme sowohl mit als auch ohne eingeschlossenen Wirkstoff kaum ändern. Bei beiden Systemen konnte in Kapitel 3.1.3.1 gezeigt werden, dass die Morphologie der gebildeten Vesikel nicht von der Zugabe des Wirkstoffes abhängt, so dass ein ähnlicher Kurvenverlauf im Rheogramm zu erwarten war. Die Zunahme der Viskosität im Vergleich zum DSPC-haltigen VPG ist dem Zusatz der stabilisierenden TEL geschuldet, die wie bereits erläutert die Bildung von stabilen Vesikeln begünstigen und die Rigidität der Membran erhöhen [77, 143]. Da die Vesikelgröße mit steigenden TEL Anteilen zunimmt, lässt sich die etwas geringere Festigkeit des mit DSPC:TEL (70:30) hergestellten VPGs gegenüber des DSPC:TEL (80:20) Trägersystems erklären. Da die Oberfläche der Vesikel proportional zur Größe zunimmt, besitzen die beim DSPC:TEL (80:20) deutlich kleineren Vesikel eine größere Interaktionsfläche untereinander, als die des DSPC:TEL (70:30) Systems, so dass die sterische Abschirmung hier mehr zum Tragen kommt und die Viskosität geringfügig zunimmt.

Erwartungsgemäß unterscheidet sich das Fließverhalten des unbeladenen DSPC:TEL (50:50) VPG deutlich von den Wirkstoffträgersystemen mit geringerem TEL Anteil. Die innere Struktur aus TEL-rafts und angelagerten DSPC-Vesikeln des DSPC:TEL (50:50) Trägersystems sorgt bereits bei geringer mechanischer

Beanspruchung vermutlich für ein Verschieben der Platten gegeneinander, was zu einem raschen Verlust der Struktur führt, welcher schließlich in einer Abnahme der Viskosität resultiert. Das ähnliche Fließverhalten des DSPC:TEL (50:50) und des reinen DSPC-haltigen VPG stützt die Hypothese der uneinheitlichen inneren Struktur. Dieser Umstand ändert sich beim DSPC:TEL (50:50)-haltigen System drastisch bei der Zugabe des MB. Wie bereits in Kapitel 3.1.3.1 gezeigt, führt der Zusatz zu einer Umkehrung der Phasenseparation und zur Bildung von DSPC:TEL Vesikeln. Die nun vorherrschenden Begebenheiten sorgen in der Folge für eine Erhöhung der Stabilität. Wieder kommt dabei die Erhöhung der Oberfläche im Vergleich zur Größe zum Tragen. Konnten vor der Zugabe des MB nur die DSPC-Vesikel mit der Oberfläche der TEL-rafts interagieren, ist nach der Zugabe die Interaktion von vielen, vermutlich einheitlich großen Vesikeln untereinander möglich, die durch die sterische Abschirmung die Viskositäts-erhöhung bedingen.

## **3.2. Wirkstoffträgersysteme aus synthetischen Bolaamphiphilen**

### **3.2.1. Charakterisierung der Hydrogele**

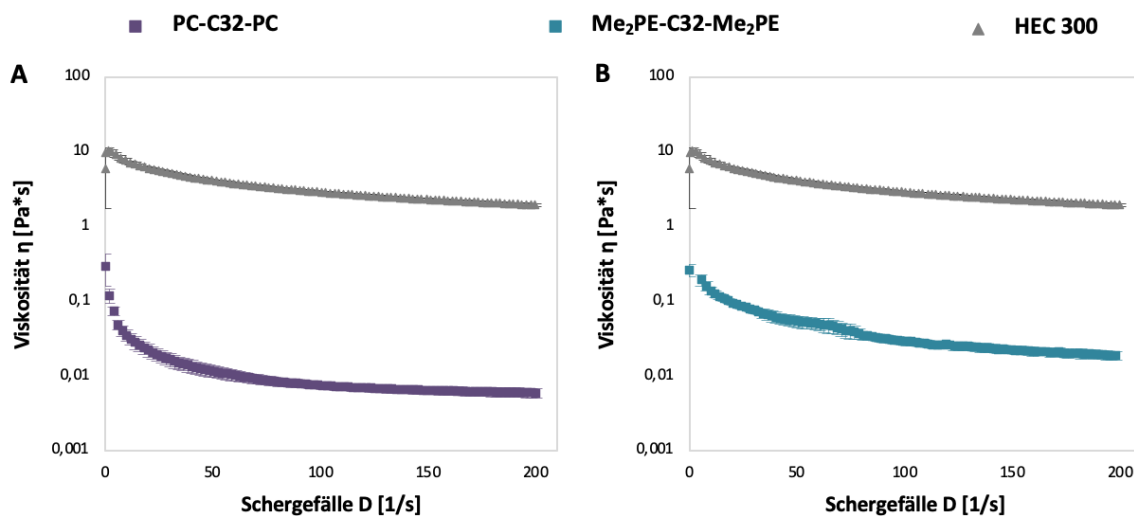
Die für diese Arbeit genutzten klar und farblos erscheinenden Hydrogele aus den synthetischen Bolaamphiphilen PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE mit jeweils einer Konzentration von 5 mg/mL (vgl. Abbildung 22 auf Seite 57), sowie die als Referenz herangezogenen HEC 300 Hydrogele gleicher Konzentration, wurden, wie in den Kapiteln 2.2.1 bzw. 2.3 beschrieben, hergestellt.

Die Herstellung der PC-C32-PC- und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE-haltigen Hydrogele erfolgt im Unterschied zur Bildung des HEC 300 Hydrogels unter Anwendung eines +100 °C Wasserbades, in welchem die festen Bolaamphiphile im Dispersionsmedium unter zusätzlich zugeführter mechanischer Belastung dispergiert wurden, was zu einer Bildung von zunächst kleineren mizellaren Aggregaten führte. Erst bei Abkühlung auf Raumtemperatur bildeten sich in der Folge rasch die Nanofasern aus, in der die Verfestigung des Systems begründet liegt [106].

Zügig nach Eintritt der Gelbildung konnten die rheologischen Eigenschaften mittels Rotationsviskosimeter bestimmt werden (siehe Kapitel 2.4.1). Im Gegensatz zu den Wirkstoffträgersystemen, welche mit DSPC und DSPC:TEL hergestellt wurden, konnte bei einer Zugabe des Wirkstoffes MB zu den Hydrogelen aus synthetischen

Bolaamphiphilen makroskopisch keine Änderung der Konsistenz festgestellt werden, so dass auf eine genauere Untersuchung verzichtet wurde.

Die graphische Auftragung der Messdaten beider Hydrogele sind in Abbildung 21 als Rheogramm dargestellt und zeigen sowohl beim PC-C32-PC-, als auch beim Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>Pe-haltigen Trägersystem eine Abnahme der Viskosität bei minimaler Scherbeanspruchung im Vergleich zum HEC 300 Hydrogel.

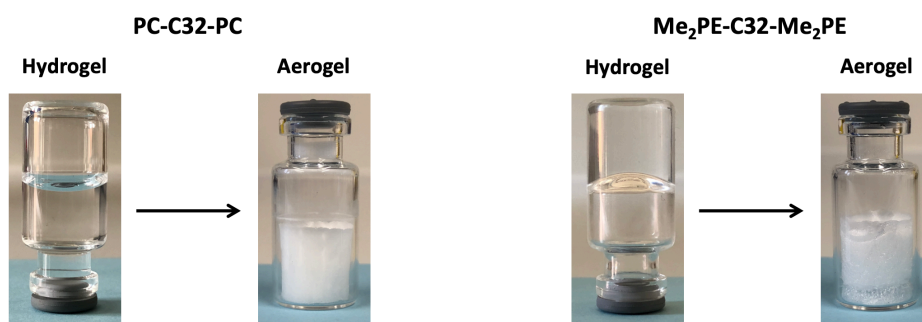


**Abbildung 21:** Rheogramm der beiden synthetischen Bolaamphiphilen PC-C32-PC (A) und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE (B) hergestellten Hydrogele im Vergleich zum HEC 300 Hydrogel. Alle Wirkstoffträgersysteme ohne Methylenblau.

Dieser Umstand lässt sich durch die unterschiedliche Gelstruktur beider Systeme erklären. Die Wasserbindungskapazität des HEC 300 Hydrogels liegt, wie bereits in Kapitel 3.1.3.3 erläutert, vordergründlich in der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den HEC 300 Fasern mit dem umgebenden Medium begründet. Die Gelbildung von PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE beruht hingegen auf ihrer Eigenschaft der selbstorganisierten Bildung von helikalen Nanofasern im wässrigen Medium, in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration der Lipide, und dem pH-Wert des Dispersionsmittels [109]. Diese Selbstorganisation der teilweise mehrere µm langen Nanofasern wird hauptsächlich durch hydrophobe Van-der-Waals Wechselwirkungen der langen Alkylkette verursacht. Die beobachtete, geringere Stabilität der Bolaamphiphil-haltigen Hydrogele im Gegensatz zur Referenz aus HEC 300 könnte mit den schwachen Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Ketten der Bolaamphiphile erklärt werden, welche den kovalenten Bindungen im HEC 300-Molekül entgegenstehen [145]. Die Stabilisierung der langen

Alkylkette durch die Wasserstoffbrückenbindungen der hydrophilen Kopfgruppen der einzelnen Bolaamphiphilen untereinander reicht nicht aus, um dem Zerfall der entstandenen Nanofasern durch minimale Scherkräfte entgegenzuwirken. Dieser Zerfall geht mit der raschen Abnahme der Viskosität und dem Verlust der Gelstruktur einher. Die sehr geringe mechanische Beanspruchbarkeit der PC-C32-PC- und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE-haltigen Hydrogele lässt den Schluss zu, dass diese in dieser Form für den Einsatz als Wirkstoffträgersysteme nur mäßig geeignet sind.

Gefriergetrocknete Gele auf Basis von Cellulosen werden wie eingangs erwähnt als intelligente Wundauflagen (Gazen) bereits in der Therapie von tiefen Wunden eingesetzt, da sie viele der an sie gestellten Anforderungen erfüllen [7, 20]. Jedoch werden neue und effektivere Materialien für die Herstellung geeigneter Verbände noch immer gesucht [20]. Durch die Entfernung der mobilen Phase (Wasser) mittels Lyophilisation könnten die mit synthetischen Bolaamphiphilen hergestellten Wirkstoffträgersysteme (Aerogele) geeignete Kandidaten für diese Herausforderungen sein. Die aus PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE hergestellten Hydro- und Aerogele sind ohne eingearbeitetem Wirkstoff Methylenblau in Abbildung 19 dargestellt.

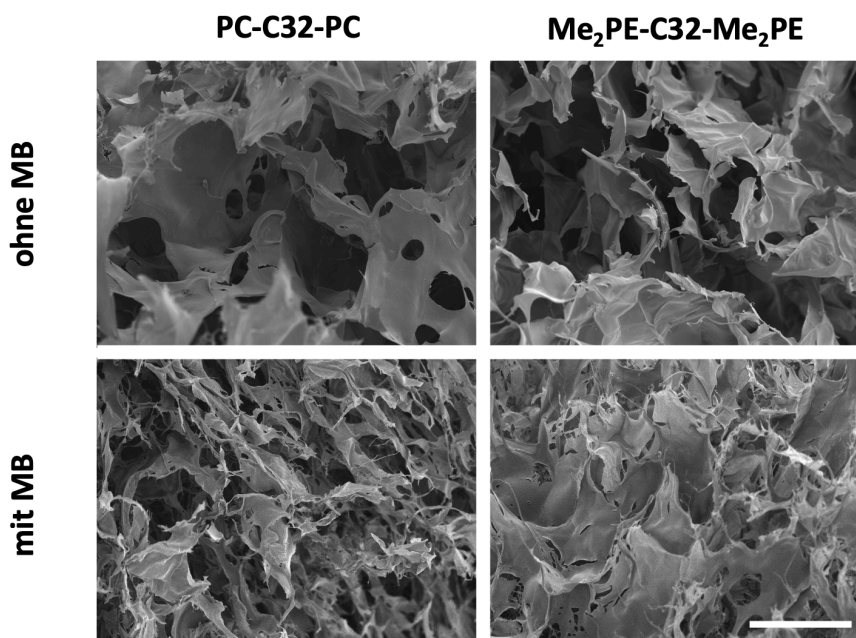


**Abbildung 22:** Makroskopische Bilder der aus PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE hergestellten Wirkstoffträgersystemen ohne Methylenblau.

### 3.2.2. Charakterisierung der Aerogele

Um den Einsatz der aus synthetischen Bolaamphiphilen gewonnenen Hydrogele zu optimieren, musste die mobile Phase wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben entfernt werden. Die so entstandenen weißlich erscheinenden Aerogele (siehe Abbildung 22) zeigten alle erwartungsgemäße eine sehr viel höhere mechanische Stabilität, als die ursprünglichen Hydrogele. Unter Zuhilfenahme der Rasterelektronenmikroskopie

konnte die Oberflächenbeschaffenheit der erhaltenen Wirkstoffträgersysteme visualisiert werden (siehe Kapitel 2.4.2). Abbildung 23 zeigt die Oberflächen der Aerogele unter dem Rasterelektronenmikroskop bei 200-facher Vergrößerung mit und ohne Methylenblau.



**Abbildung 23:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Wirkstoffträgersysteme bei 200-facher Vergrößerung. Der Maßstabsbalken entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

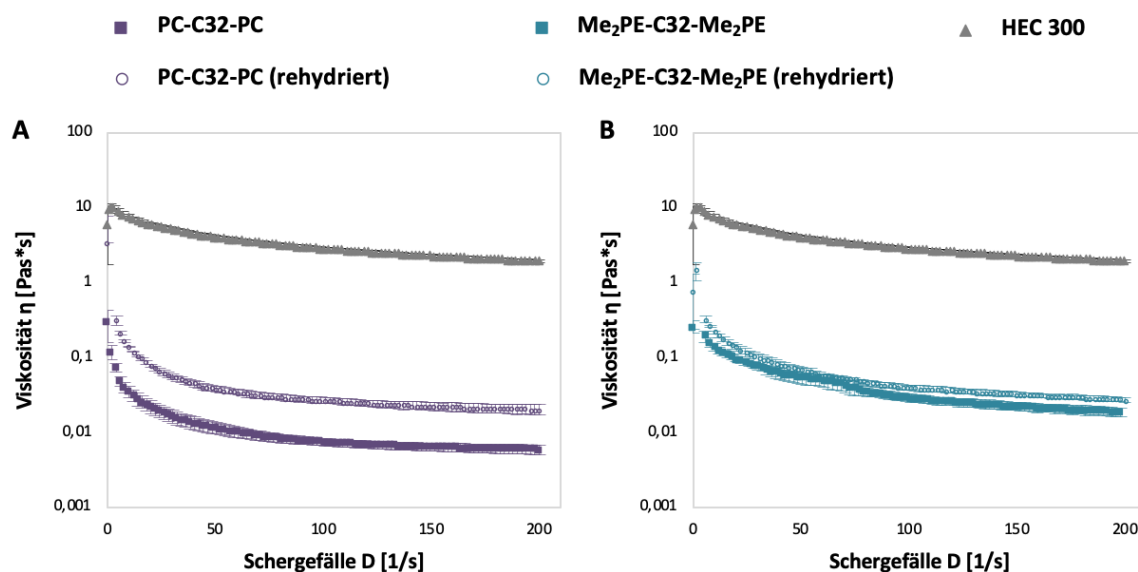
Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist deutlich sichtbar, dass die Aerogele aus PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE eine poröse Oberflächenstruktur aufweisen, die mit denen von gefriergetrockneten Hydrogelen vergleichbar ist [134-137]. Die Morphologie der Trägersysteme erscheint locker, mit großen Zwischenräumen zwischen dem Lipidgerüst, verglichen mit den aus DSPC und DSPC:TEL hergestellten Trägersystemen. Dieser Umstand liegt sicherlich in den geringeren Massenanteilen Lipid zu Medium begründet. Im Gegensatz zu den bei den DSPC- und DSPC:TEL (50:50)-haltigen VPGs herrschenden strukturellen Unterschieden zwischen den Wirkstoffträgersystemen mit und ohne eingearbeiteten Wirkstoff, ist hier kein morphologischer Unterschied sichtbar. Dieser Befund deckt sich mit den makroskopischen Beobachtungen und ist ein Hinweis auf eine gleichbleibende Stabilität der Trägersysteme mit eingeschlossenem Wirkstoff.

Die hohe Anzahl von sehr großen Poren führt zu einer hohen Exposition des Aerogelgerüsts mit dem umgebenden Medium und somit zu einer rascheren



Hydratisierung der Wirkstoffträgersysteme. Nach Zugabe, der zuvor äquivalent durch den Gefriertrocknungsprozess entfernter Menge Wasser, bildeten sich *in situ* aus den Aerogelen wieder Hydrogele aus, wobei sich zwischen beiden synthetischen Bolaamphiphilen unterschiedliche Hydratisierungsgeschwindigkeiten feststellen ließen. Während PC-C32-PC innerhalb kürzester Zeit wieder ein Hydrogelsystem ausbildete, trat dieses Verhalten bei Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE erst nach mehreren Tagen und höheren Temperaturen von 37,8 °C auf. Erklären lässt sich die unterschiedlich schnelle Ausbildung des Hydrogeles mit der chemischen Struktur der sich im Hydrogel formenden Nanofasern. Die Me<sub>2</sub>PE-Kopfgruppe des Bolaamphiphiles stabilisiert durch Wasserstoffbrückenbindungen die Struktur der Nanofasern im Hydrogel. Aufgrund dessen können weniger Wasserstoffbrückenbindungen mit der umgebenden Flüssigkeit gebildet werden als beim PC-C32-PC-haltigen Aerogel.

Die rheologischen Eigenschaften dieser, aus den Aerogelen gewonnen, Hydrogele wurden mit den konventionell hergestellten verglichen (siehe Abbildung 24).



**Abbildung 24:** Rheogramm der beiden synthetischen Bolaamphiphilen PC-C32-PC (A) und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE (B), sowohl als Hydrogele (volle Kästchen), als auch als rehydrierte Aerogele (leere Kreise) im Vergleich zum HEC 300 Hydrogel (volle Dreiecke). Alle Wirkstoffträgersysteme ohne Methylenblau.

Die mittels Rotationsviskosimeter erhaltenen Daten zeigten ein geringfügig anderes Verhalten des komplett hydratisierten Aerogels aus PC-C32-PC verglichen mit dem konventionell hergestellten Hydrogel, bei welchem die Viskosität geringer war.

Im Fall von Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE waren bei beiden Hydrogelen nahezu die gleichen rheologischen Eigenschaften messbar. Die Erwärmung des Aerogel-Wasser-Gemisches aus Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE auf Körpertemperatur bewirkte offensichtlich die beginnende Hydratisierung des Lipidgerüsts. Ein Grund, warum das komplett hydrierte Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE-haltige Aerogel eine nahezu identische Stabilität wie das zuvor aus dem festen Lipid hergestellte Hydrogel aufwies, könnte an der im Vergleich zum PC-C32-PC-haltigen System, langsameren Rückbildung des Hydrogels liegen.

Die Arbeitsgruppe um Alfred Blume postulierte 2004, dass sich die Viskosität bei Proben, die längere Zeit bei Raumtemperatur gehalten wurden stark erhöhte und führten dies auf die Bildung von längeren Nanofasern zurück [108]. Da das aus dem Aerogel aus PC-C32-PC rückgebildete Hydrogel längere Zeit komplett hydriert vorlag, konnte es im Vergleich zu seinem Pendant eine stabilere Gelstruktur ausbilden, was sich in einer erhöhten Viskosität widerspiegelt.

#### **4. Freisetzung von Methylenblau aus den Wirkstoff-trägersystemen – Ergebnisse und Diskussion**

Halbfeste Hydrogele haben zumeist eine starke adhäsive Wirkung und können sowohl bukkal, sublingual, vaginal oder als bioabbaubare Wirkstoffreservoir in Wundhöhlen eingesetzt werden [144]. Die adäquate und kontrollierte Arzneimittelfreisetzung ist dabei wesentlicher Bestandteil eines guten Wirkstoffträgersystems.

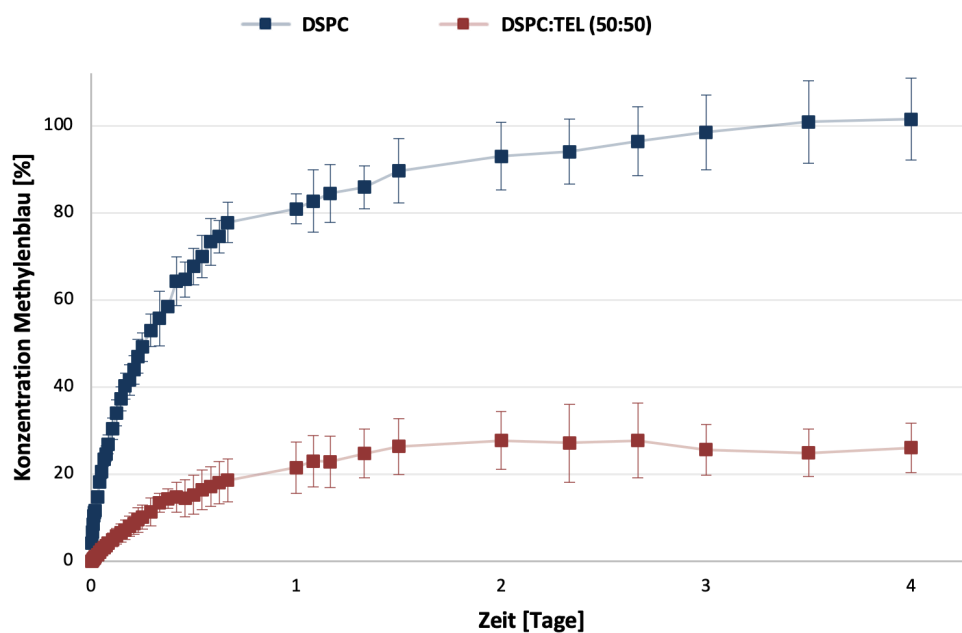
Die Freisetzungsrates des Wirkstoffes aus dem Trägersystem hängt von mehreren unterschiedlichen Faktoren, wie beispielsweise von Material und Beschaffenheit des Trägersystems, sowie nicht zuletzt von dem Applikationsort selbst ab. Im folgenden Versuch wurde das Freisetzungsverhalten der in den Kapiteln 2.1 und 2.2 gewonnenen Wirkstoffträgersysteme wie unter 2.5 beschrieben mittels Franz-Diffusionszellen charakterisiert. Ihr Aufbau aus einer nach oben hin offenen Donorkammer welche durch eine für das Akzeptormedium durchlässigen Membran zur Akzeptorkammer hin begrenzt ist, sorgt für einen stetigen Flüssigkeitskontakt des Wirkstoff-trägersystems, so dass die Bedingungen am späteren Applikationsort (Schleimhaut bzw. Wundbett) *in vitro* annähernd nachgestellt werden können. Als Akzeptor-

medium wurde physiologischer Phosphatpuffer (PBS-Puffer pH 7,4) gewählt und die Temperatur auf 37,8 °C festgelegt [146].

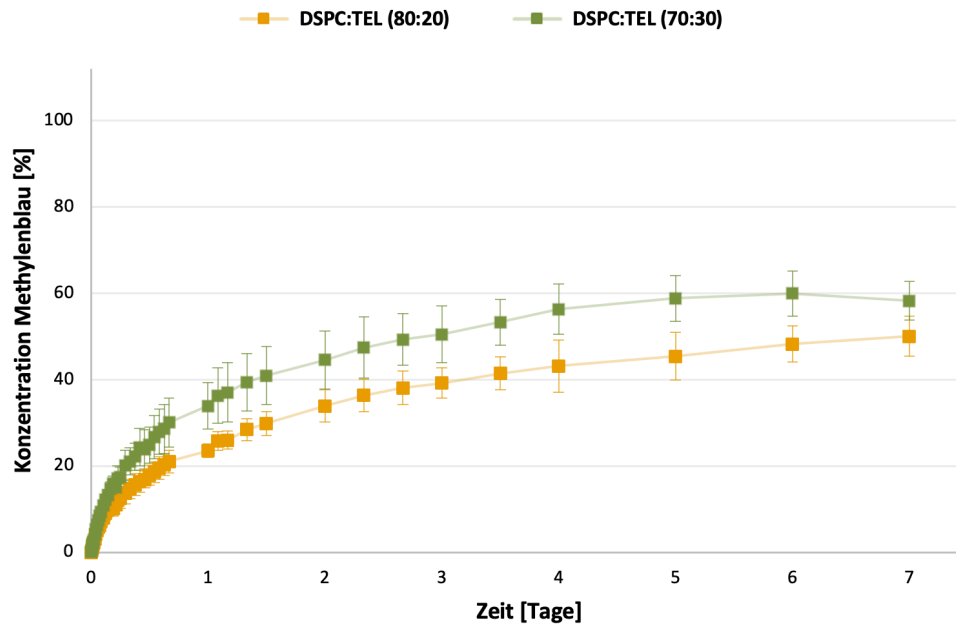
#### 4.1. Vesikuläre Phospholipid Gele aus Tetraether- und Phospholipiden

Wie bereits in Kapitel 1.5.1.3 beschrieben ist die Einschlusseffizienz von hydrophilen Wirkstoffen in VPGs besonders hoch. Aufgrund der Tatsache, dass das Volumen in und außerhalb der Vesikel ungefähr gleich groß ist, entfällt im Gegensatz zur Herstellung von liposomalen Formulierungen die Abtrennung des nicht verkapselten Wirkstoffes [147]. Dabei wirkt der sich außerhalb der Vesikel befindliche Wirkstoff als Initialdosis, während der eingeschlossene Wirkstoff retardiert freigesetzt wird [97, 98, 147].

Betrachtet man vor diesem Hintergrund die in den Abbildungen 25 und 26 gezeigten kumulativen Freisetzungsdaten des Wirkstoffes MB aus den mittels DSPC, DSPC:TEL (80:20), DSPC:TEL (70:30) und DSPC:TEL (50:50) hergestellten VPGs, so scheinen die generierten Daten die Theorie der Initialdosis zu bestätigen. Innerhalb der ersten 24 Stunden setzten alle VPGs das enthaltene MB sehr schnell frei, was anhand des anfänglich steilen Kurvenverlaufs sichtbar wird.



**Abbildung 25:** Freisetzungsprofile der Wirkstoffträgersysteme aus DSPC und DSPC:TEL (50:50).



**Abbildung 26:** Freisetzungsprofile der Wirkstoffträgersysteme aus DSPC:TEL (80:20) und DSPC:TEL (70:30).

Wie bereits in Kapitel 2.5 erläutert, fand mithilfe graphischer Auftragung der ermittelten Daten und anschließender Überprüfung der Übereinstimmung mit mathematischen Modellen, eine Bestimmung der Freisetzungsprofile statt. Wies das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) der zwischen den Datenpunkten gezogenen, linearen Regression einen Wert oberhalb von 0,9 auf, so ist eine ausreichende Übereinstimmung zwischen den aufgetragenen Daten und dem zugrundeliegenden Modell gegeben. Die ermittelten  $R^2$ -Werte, sowie die sich aus der mathematischen Formel der linearen Regression ergebenden, spezifischen Konstanten sind in Tabelle 4 aufgeführt.

VPG	ermitteltes Modell	Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ )	Konstante (k)
DSPC	Korsmeyer-Peppas	0,9611	0,4763
DSPC:TEL (80:20)	Higuchi	0,9768	20,915
DSPC:TEL (70:30)	Higuchi	0,9458	26,205
DSPC:TEL (50:50)	Higuchi	0,8892	16,938

**Tabelle 4:** Ergebnisse der graphisch ermittelten mathematischen Modelle zur Beschreibung der Freisetzungsprofile mit dazugehörigen Bestimmtheitsmaßen und Konstanten der aus DSPC und DSPC:TEL hergestellten Wirkstoffträgersysteme.

Das mathematische Modell nach Korsmeyer-Peppas stellt einen Zusammenhang zwischen den freigesetzten Anteilen des Wirkstoffes ( $M_t/M_\infty$ ), der Zeit ( $t$ ), der Geschwindigkeitskonstanten ( $k$ ) und dem Freisetzungsexponenten ( $n$ ) her [117, 118] und wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k * t^n$$

Der Freisetzungsexponent beschreibt dabei den maßgeblich bestimmenden Freisetzungsmechanismus und wird für kugelförmige Körper wie folgt eingeteilt:

Freisetzungsexponent (n)	Mechanismus
0,43	Fick'sche Diffusion
$0,43 < n < 0,85$	anormaler Transport
0,85	konstante Freisetzung

**Tabelle 5:** Beziehung zwischen dem Freisetzungsexponenten der Korsmeyer-Peppas Gleichung und dem zugrundeliegenden Freisetzungsmechanismus [148].

Der Freisetzungsexponent für das mittels DSPC-hergestellte Wirkstoffträgersystem ergab einen Wert von  $n = 0,4582$ , welches einen anormalen Transport aus der Arzneiform definiert. Folgt man der Literatur zu Freisetzungsvorgängen aus VPGs gibt es grundsätzlich zwei gleichzeitig stattfindende, konkurrierende Mechanismen die zu einer Freisetzung des eingeschlossenen Wirkstoffes führen: Die Abtragung der Phospholipidmatrix, d.h. das Ablösen der mit Wirkstoff gefüllten Vesikeln aus dem Gesamtverband und damit einhergehend die Freisetzung des nicht in die Vesikeln eingeschlossenen Wirkstoffes, sowie die Diffusion des Wirkstoffes aus den Vesikeln entlang eines Konzentrationsgradienten [149]. Jedoch sind nach Möckel *et al.* erst bei einem Wert von 0,66 für  $n$  sowohl Diffusionsprozesse als auch die Abtragung der Matrix des Trägersystems gleichermaßen an der Freisetzung beteiligt, so dass davon auszugehen ist, dass die Freisetzung aus dem VPG vorwiegend durch die Diffusion des Wirkstoffes aus der Matrix gesteuert wurde [150]. In Abbildung 22 ist deutlich zu erkennen, dass innerhalb der ersten 24 Stunden das DSPC-haltige Gelsystem bereits über 80% des eingeschlossenen Wirkstoffes freisetzte. Dieser Umstand lässt weiterhin den Schluss zu, dass das DSPC-haltige VPG nicht die gleiche Stabilität aufwies, wie die anderen Wirkstoffträgersysteme, die sowohl eine deutlich langsamere

Anfangsfreisetzung als auch eine geringere Freisetzungskonzentration des MB zeigten. Der Kurvenverlauf lässt vermuten, dass es bereits nach etwa 1,5 Tagen zu einer beginnenden Abtragung gekommen sein muss. Aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften liegt DSPC unterhalb seiner  $T_c$  von 56 °C geordnet und dicht gepackt vor. Bedingt durch die dadurch entstehende sterische Hinderung der Vesikel untereinander kann es zu einer erleichterten Freisetzung des Wirkstoffes an den Rändern zwischen den Vesikeln kommen. An Tag 4 endete die Freisetzung aus den mit DSPC hergestellten VPGs mit einer 100%igen Freisetzung des Wirkstoffes.

Alle Freisetzungsprofile der mit DSPC:TEL hergestellten Wirkstoffträgersysteme folgten dem von Higuchi 1963 beschriebenen mathematischen Modell einer matrixgesteuerten Diffusion, in welchem die abgegebene Menge Wirkstoff ( $M_t$ ) aus der Arzneistoff mit der Fläche ( $A$ ) von der Quadratwurzel der Zeit ( $t$ ) in Abhängigkeit steht [116, 151]. Dabei liegt dem Modell unter Einbezug der Freisetzungskonstanten ( $k$ ) folgende Gleichung zu Grunde:

$$\frac{M_t}{A} = k * \sqrt{t}$$

Oder in der klassischen Schreibweise:

$$\frac{M_t}{A} = \sqrt{2 C_0 D C_s t}$$

Dabei bezeichnet  $C_0$  die Ausgangskonzentration in der Trägermatrix,  $D$  den Diffusionskoeffizienten und  $C_s$  die Sättigungskonzentration im Matrixmaterial. Im Gegensatz zu dem Modell nach Korsmeyer-Peppas bezieht Higuchi die Diffusionsfläche ( $A$ ) in seine Gleichung ein. Die an der Grenzfläche abnehmende Konzentration des Wirkstoffes führt zu einem längeren Diffusionsweg des im Inneren der Arzneiform befindlichen Wirkstoffes, so dass daraus eine retardierte Freisetzung desselbigen resultiert welche insbesondere in Abbildung 26 gut erkennbar ist.

Im Gegensatz zum reinen DSPC-haltigen Wirkstoffträgersystem war keines der mit unterschiedlichen Massenanteilen TEL hergestellten Systeme in der Lage 100% Wirkstofffreisetzung zu erreichen. Bereits 1994 konnte E. L. Chang darstellen, dass Vesikel mit in der Membran eingeschlossenen TEL hydrophile Wirkstoffe erschwerter freisetzen, als solche ohne TEL [152]. Am wenigsten Wirkstoff setzte das aus DSPC:TEL (50:50) bestehende Trägersystem frei. Diese Tatsachen kann mit der

Struktur des Systems in Verbindung gebracht werden. Wie bereits in den REM Aufnahmen in Kapitel 3.1.3.1 ersichtlich, besteht das Hydrogel mit eingeschlossenem MB aus vesikulären Strukturen, die mutmaßlich zu 50% aus TEL bestehen. Diese sehr hohe Menge an TEL führen wiederum zu sehr großen, aber gleichzeitig rigiden Vesikeln, die nur aufgrund der Interaktionen mit dem Wirkstoff Bestand haben. Da der Wirkstoff für die Stabilität des Systems von großer Bedeutung und in der Struktur fest eingebunden ist, steht er nicht für die Freisetzung zur Verfügung. Beide für die Freisetzung postulierten Mechanismen können daher hier nicht in ausgeprägter Form zum Tragen kommen. Die Abtragung des Vesikelgerüsts ist aufgrund der hohen vorherrschenden Stabilität des Systems unwahrscheinlich. Weiterhin führt die Rigidität der gebildeten Strukturen zu einer erschwerten Diffusion des Wirkstoffes aus den Vesikeln. Gleichzeitig liegt das Bestimmtheitsmaß für ein Freisetzungsprofil nach Higuchi lediglich bei  $R^2 = 0,8892$  für die analog zum DSPC-haltigen VPG ebenfalls nur 4 tägig anhaltende Freisetzung. Von allen überprüften mathematischen Modellen entsprach dieses Bestimmtheitsmaß am ehesten der Untergrenze von  $R^2 = 0,9$  für eine eindeutige Zuordnung zu einem Freisetzungsmodell. Anhand des ermittelten Bestimmtheitsmaßes von bei  $R^2 = 0,8892$  ist jedoch anzunehmen, dass das aus DSPC:TEL (50:50) bestehende Wirkstoffträgersystem über diesen Zeitraum nicht ausschließlich diesem Freisetzungsprofil folgt. Bei der Auftragung der ermittelten Werte bis einschließlich des dritten Tages der Freisetzung gegen die Quadratwurzel der Zeit lag das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  der linearen Regression bei 0,9626 wonach die Freisetzung innerhalb der ersten drei Tage durchaus dem mathematischen Modell nach Higuchi folgt. Dieser Umstand bestätigt abermals, dass der Wirkstoff auf die Struktur einen großen Einfluss nimmt, da mit abnehmender Wirkstoffmenge auch der Freisetzungsmechanismus beeinflusst wird. Innerhalb der letzten 24 Stunden der Freisetzung folgte diese keinem der geprüften mathematischen Modelle und endete mit 26%iger Wirkstoffabgabe.

Mehrere Arbeitsgruppen postulierten, dass zunehmende Mengen an Phospholipiden die Freisetzung aus VPGs verlangsamen [98, 147]. Da ebenfalls bekannt ist, dass mit zunehmender Lipidkonzentration auch die mechanische Stabilität der Systeme steigt, ist anzunehmen, dass dieser Parameter ebenfalls einen entscheidenden Faktor für die Freisetzungsgeschwindigkeit darstellt. Diese Annahme wird durch die über eine Woche andauernde Freisetzung der aus DSPC:TEL (80:20) und DSPC:TEL (70:30) hergestellten Wirkstoffträgersysteme bekräftigt (siehe Abbildung 23). Wie die rheologischen Daten bereits zeigten, weisen beide VPGs eine sehr hohe Stabilität auf, die mit ihrer Struktur in Zusammenhang steht. Die Freisetzungsprofile beider

Wirkstoffträgersysteme folgen dem mathematischen Modell nach Higuchi und unterschieden sich nur hinsichtlich der Freisetzungsmenge des MB. Während DSPC:TEL (70:30) annähernd 60 % des eingeschlossenen Wirkstoffes freisetzen konnte, waren es bei DSPC:TEL (80:20) etwa 10 % weniger. Ein Grund dafür kann ebenfalls in der leicht anderen Vesikelstruktur zu finden sein. Die cryo-TEM Aufnahmen zeigten im Fall der verdünnten DSPC:TEL (70:30)-haltigen Probe etwa 500 µm große Vesikel, die somit etwa 5-mal so groß waren, wie die etwa 100 µm großen Strukturen im DSPC:TEL (80:20) Pendant. Die kleinen Vesikel der DSPC:TEL (80:20) enthaltenen VPGs sind schlechter in der Lage, sich aus dem Gesamtkomplex zu lösen, da sie aufgrund ihrer proportional großen Oberfläche mehr Interaktionspotential untereinander aufweisen, als die größeren Vesikel der DSPC:TEL (70:30) Trägersysteme, so dass bei letzteren das Phänomen der Abtragung mehr Gewicht hat. Bedingt durch dieses Phänomen werden große Vesikel aus dem Gesamtverband in das umgebende Medium entlassen. Zwar sind die Vesikel der DSPC:TEL (70:30)-Systeme aufgrund ihres höheren TEL-Anteils etwas rigider als selbige aus DSPC:TEL (80:20), dennoch ist in ihnen volumenbedingt mehr MB eingeschlossen, so dass der Konzentrationsgradient des im Vesikelinneren befindlichen Wirkstoffes zum Außenmedium größer ist und die Diffusion vermutlich leichter stattfinden kann.

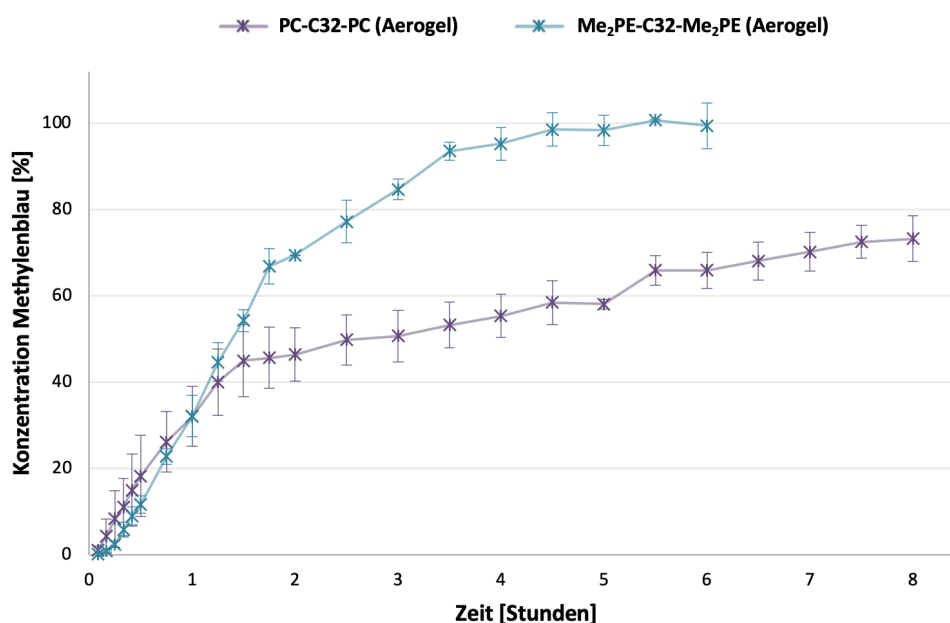
#### **4.2. Hydro- und Aerogele aus synthetischen Bolaamphiphilen**

Die Fähigkeit von klassischen Hydrogelsystemen ihre eingeschlossenen Wirkstoffe freizusetzen, wurde in den letzten Jahren bereits ausführlich beschrieben [17, 153]. Die überwiegende Mehrheit der theoretischen Modelle basiert dabei auf Diffusionsgleichungen. In Abhängigkeit des zugrundeliegenden geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes der Freisetzung wird diese in diffusions-, quellungs- oder chemisch kontrollierte Freisetzung unterteilt [17]. Alle Modelle eint jedoch die Tatsache, dass das Phänomen der Diffusion eng mit der Struktur des Materials in Zusammenhang steht, durch das die Diffusion stattfindet.

Sowohl die Freisetzungsprofile der aus PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE bestehenden Aerogele als auch das der Hydrogele wurden mittels Franz-Diffusionszellen bestimmt. Da die Gelbildung beider Bolaamphiphile auf Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen ist und sich dieses Verhalten im Gegensatz zu dem der VPGs mit klassischen Hydrogelbildnern wie HEC 300 vergleichen lässt,



wurde letzteres als Referenz für die Freisetzung aus den Hydrogelsystemen herangezogen. Geprägt durch die Tatsache, dass die Hydrogele selbst aufgrund ihrer geringen mechanischen Stabilität nicht als Wirkstoffträgersysteme am späteren Applikationsort geeignet sind, wurden zunächst die Freisetzungsprofile der Aerogele bestimmt. Im Anschluss fand in Adaption der Beobachtungszeit die Charakterisierung der Hydrogele statt, um beide Systeme miteinander vergleichen zu können. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 27 und 28 dargestellt.



**Abbildung 27:** Freisetzungsprofile der PC-C32-PC- und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE-haltigen Aerogele.

Die graphische Auftragung der logarithmierten Werte des im Trägersystems verbliebenen Wirkstoffes gegen die Zeit ergab für beide Aerogele lineare Bereiche mit hohen Bestimmtheitsmaßen, so dass anzunehmen ist, dass beide Systeme dem Freisetzungsprofil der 1. Ordnung folgen.

Aerogel	ermitteltes Modell	Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ )	Konstante (k)
PC-C32-PC	1. Ordnung	0,9380	-0,1536
Me <sub>2</sub> PE-C32-Me <sub>2</sub> PE	1. Ordnung	0,9687	-0,8818

**Tabelle 6:** Ergebnisse der graphisch ermittelten mathematischen Modelle zur Beschreibung der Freisetzungsprofile mit dazugehörigen Bestimmtheitsmaßen und Konstanten der Aerogele aus den synthetischen Bolaamphiphilen PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE.

Folgt ein Trägersystem der Kinetik 1. Ordnung so ist die freigesetzte Wirkstoffkonzentration ( $M_t$ ) nicht konstant, sondern direkt proportional zur jeweils vorhandenen Konzentration [154]:

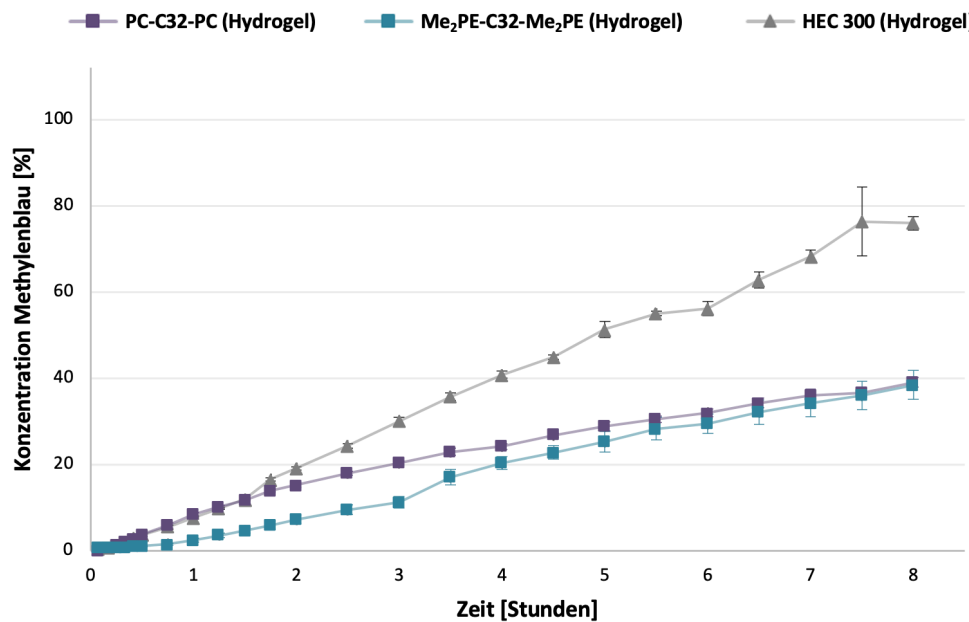
$$M_t = M_0 * e^{-k * t}$$

Dabei stellt  $M_0$  die Anfangskonzentration in der Arzneiform dar. Diese konzentrationsabhängige Freisetzung des MB aus den Wirkstoffträgersystemen ist in Abbildung 27 deutlich anhand des anfänglich sehr steilen Kurvenverlaufes sichtbar, die mit einer schnellen Freisetzungsrates zu Beginn einhergeht. Die Freisetzung aus den gefriergetrockneten Hydrogelen erfolgte dabei quellungskontrolliert. In den ersten 1,5 Stunden unterschieden sich die Freisetzungsrates beider Aerogele nicht voneinander, da die Freisetzung in dieser Zeit hauptsächlich durch das rasche Herauslösen der an der gefriergetrockneten Oberfläche befindlichen MB Molekülen beeinflusst wird. Durch den zunehmenden Eintritt des Akzeptormediums in die quellbaren Wirkstoffträgersysteme erfolgt die Hydratisierung und führt schlussendlich zum Einsetzen der Gelbildung. Nach Ausbildung dieser Gelbarriere wechselt die Freisetzung von quellungskontrolliert, zu diffusionskontrolliert, was sich durch die flacher werdende Freisetzungskurve bemerkbar macht. Die quellungskontrollierte Freisetzung scheint für das Aerogel aus PC-C32-PC nach 1,5 Stunden erreicht zu sein, während bei dem Trägersystem mit Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE weiterhin ein starker Anstieg der MB-Konzentration erkennbar ist.

Wie bereits ausgeführt, hängt die Freisetzungsrates von Aerogelen mit der Hydratisierung zusammen. Weitere Einflussfaktoren sind jedoch ebenfalls die Geschwindigkeit des Wassereinstroms in das Aerogel – und damit die Hydratisierungsgeschwindigkeit – und die Wechselwirkungen von MB mit dem gefriergetrockneten Grundgerüst. Durch die anfängliche Abwesenheit des Wassers bei den Aerogelen ist die Bindung des MB an die Nanofasern des Lipidgerüsts schwächer ausgeprägt als in den Hydrogelen, was zu einer sehr schnellen Anfangsfreisetzung führt. Die höhere Freisetzungsrates des Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE-Systems im Vergleich zum Aerogel mit PC-C32-PC könnte durch die langsamere Hydratisierung erklärt werden. Wie bereits in Kapitel 3.2 erläutert, benötigt das PC-C32-PC-haltige Aerogel im Gegensatz zum selben Trägersystem mit Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE nur wenige Stunden, bis sich das Gelgerüst wieder vollständig gebildet hat. Die vollständige Hydratisierung des Wirkstoffträgersystems aus Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE fand dagegen erst nach mehreren

Tagen statt, so dass die Freisetzung des eingeschlossenen MB bereits vor der Rückbildung des Hydrogels abgeschlossen war.

Da der Freisetungszeitraum der Aerogele 8 Stunden nicht überschritt, wurde die Beobachtungszeit der Hydrogele ebenfalls auf diese Zeitspanne begrenzt (siehe Abbildung 28).



**Abbildung 28:** Freisetzungsprofile der aus PC-C32-PC, Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE und HEC 300 hergestellten Hydrogele.

Im Unterschied zu den gefriergetrockneten Trägersystemen ergaben sich für die Hydrogele voneinander abweichende mathematische Modelle zur Beschreibung der Freisetzungsprofile durch die graphische Auftragung der Datenpunkte:

Hydrogel	ermitteltes Modell	Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ )	Konstante (k)
PC-C32-PC	Higuchi	0,9967	15,979
Me <sub>2</sub> PE-C32-Me <sub>2</sub> PE	0. Ordnung	0,9914	5,1339
HEC 300	0. Ordnung	0,9969	10,02

**Tabelle 7:** Ergebnisse der graphisch ermittelten mathematischen Modelle zur Beschreibung der Freisetzungsprofile mit dazugehörigen Bestimmtheitsmaßen und Konstanten der Hydrogele aus den synthetischen Bolaamphiphilen PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE sowie des HEC 300 Referenz-Hydrogels.

Die Freisetzung des MB aus dem Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE-haltigen Hydrogel, sowie aus dem mittels HEC 300 hergestellten System war ausschließlich diffusionskontrolliert und folgte der Kinetik 0. Ordnung, die bei Hydrogelen oft auftritt [151]. Dabei diffundierte der wasserlösliche Wirkstoff mit gleichbleibender Geschwindigkeit aus der Gelmatrix, was mit nachfolgender Gleichung beschrieben werden kann:

$$M_t = k * t$$

Dabei bezeichnet  $M_t$  die abgegebene Menge Wirkstoff,  $k$  die Freisetzungskonstante und  $t$  die Zeit [154].

Im Gegensatz dazu folgte die Freisetzung aus dem PC-C32-PC-haltigen Hydrogel dem mathematischen Modell nach Higuchi und ist somit, analog zu den DSPC:TEL-haltigen Trägersystemen (siehe dazu Kapitel 4.1), matrixgesteuert [116]. Die kumulative Auftragung der abgegebenen MB-Konzentration in Abbildung 28 zeigt jedoch eine sehr schwache retardierende Wirkung des Trägersystems auf die Freisetzung. Über den Versuchszeitraum von 8 Stunden setzten beide aus Bolaamphiphilen hergestellten Hydrogele weniger als 40% des eingeschlossenen MB frei, während die Referenz aus HEC 300 ungefähr 75% freisetzte. Dieser Umstand kann wie bei den rheologischen Untersuchungen ebenfalls mit der Struktur der Bolaamphiphil-haltigen Hydrogele erklärt werden. Wie bereits erläutert, entsteht die Gelbildung durch die Interaktion der durch hydrophobe Van-der-Waals Kräfte zusammengehaltenen Nanofasern mit den umgebenden Wassermolekülen [108, 110]. Innerhalb dieser Nanofasern sind die Bolaamphiphile eng nebeneinander angeordnet. Aufgrund der im Vergleich zur kleineren Querschnittsfläche einer einzelnen Alkylkette größeren PC- bzw. Me<sub>2</sub>PE-Kopfgruppe, sind die bolaamphiphilen Moleküle in der Kette relativ zueinander verdreht. Diese Verdrehung führt schlussendlich zum helikalen Gerüst der Nanofasern welches hydrophobe Rillen enthält, die dem umgebenden Wasser ausgesetzt sind [155]. Sowohl hydrophobe als auch amphiphile Substanzen sind in der Lage mit diesen hydrophoben Rillen zu interagieren. In der Vergangenheit wurden solche Interaktionen bereits für Cholesterin [106], Phospholipide wie DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholin) [107] und die Fluoreszenzsonde Bis-ANS [156] berichtet. Dieser Umstand lässt die Vermutung zu, dass auch MB, welches einen Phenothiazin-Kern trägt, mit diesen hydrophoben Rillen der aus Bolaamphiphilen bestehenden Nanofasern interagiert. Dies würde die gute Annäherung des PC-C32-PC-haltigen Wirkstoffträgersystems an das mathematische Modell nach Higuchi erklären. Vergleicht man nun PC-C32-PC

und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE miteinander so fällt auf, dass die Freisetzung von MB aus letzterem trotz der vorliegenden Freisetzungskinetik nach 0. Ordnung und somit konzentrationsunabhängiger Freisetzung des Wirkstoffes etwas geringer ist, als aus PC-C32-PC. Dies könnte im Vorhandensein des in der Kopfgruppe des Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE befindlichen quartären Amins begründet liegen, welches eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zu MB bilden kann, die der Kopfgruppe des PC-C32-PC Moleküls fehlt.

Im Gegensatz zu den Bolaamphiphilen ist HEC 300 ein nichtionischer, hydrophiler Gelbildner und kann somit neben der Wasserstoffbrückenbindung zu MB keine zusätzlichen hydrophoben Wechselwirkungen zum MB-Molekül ausbilden. Aufgrund der geringeren Interaktion des Wirkstoffes ist die Freisetzung von MB aus HEC 300 somit schneller, als aus den Bolaamphiphil-haltigen Hydrogelen.

## **5. *In vitro* Untersuchung von aPDT gegen Bakterien – Ergebnisse und Diskussion**

Obwohl Antibiotikaresistenz kein neues Phänomen darstellt, so ist ihr Auftreten doch aktueller denn je. Eine 2004 in 11 US-amerikanischen Notaufnahmen durchgeführte Studie hat gezeigt, dass Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) aus 59 % der Patienten mit Haut- und Weichteilinfektionen isolieren werden kann [157]. Nach einem Bericht der WHO aus dem Jahr 2014 ist die wachsende Antibiotikaresistenz eine der größten Bedrohungen für die globale Gesundheit, da das Sterberisiko unter einer Infektion mit resistenten Keimen doppelt so hoch ist, wie unter einer Infektion die durch nicht resistente Bakterien verursacht wurde [63]. Aufgrund dessen hat die Suche nach alternativen, sicheren und effizienten antibakteriellen Strategien große Relevanz. Der unselektive Wirkmechanismus der aPDT und das daraus resultierende breite Wirkspektrum bieten daher eine gute Alternative zur konventionellen Antibiotikatherapie. Bereits 1997 konnte die Arbeitsgruppe um P. A. Wright belegen, dass der MRSA-Stamm gegenüber der aPDT genauso empfindlich reagierte, wie die nicht resistenten Vertreter ihrer Art [158].

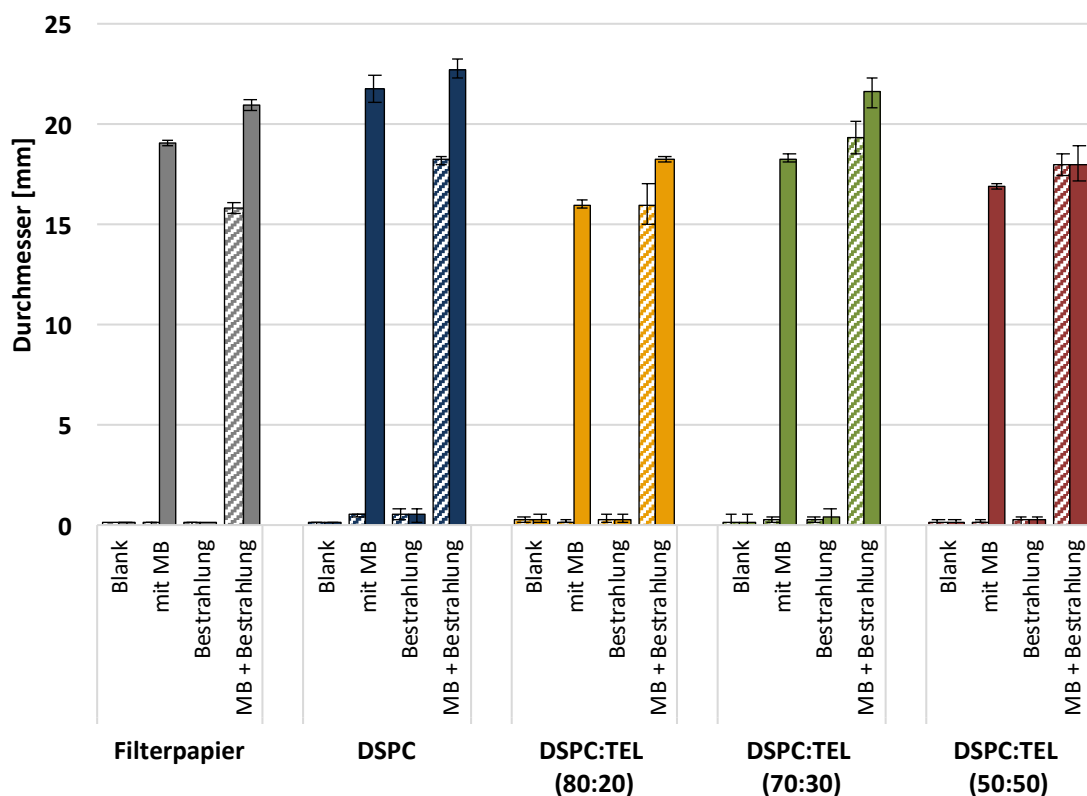
Akute und chronische Wunden, die mit multiresistenten Bakterien infiziert sind, stellen wie eingangs beschrieben ein besonders hohes Gesundheitsrisiko für die Bevölkerung dar. Studien haben gezeigt, dass Wundinfektionen meist polymikrobiell

sind, daher fand die *in vitro* Untersuchung der Wirksamkeit der aPDT der in den Kapiteln 2.1.2 und 2.2.2 hergestellten Wirkstoffträgersysteme mit enthaltenem MB sowohl an grampositiven als auch an gramnegativen Erregern statt [6].

## **5.1. aPDT gegen grampositive Bakterien**

### **5.1.1. *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis***

*Staphylococcus* spp. sind in etwa 70 % aller Wunden anzutreffen. Obwohl *Staphylococcus aureus* als wichtigster Erreger gilt sind andere Arten wie die im natürlichen Mikrobiom der Haut vorkommenden Bakterien *S. epidermidis* und *S. hominis* ebenfalls involviert [3, 10, 157]. Als Modellkeim für eine Staphylokokken-Infektion wurden aus den Nüstern gesunder Kühe isolierte *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* (DSM 18669) Kulturen genutzt, die im Institut bei -80 °C gelagert waren [159]. Wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben konnte die Wirkung der aPDT gegenüber dem grampositiven Keim anhand der Größe des im MH-Agar auftretenden Hemm- bzw. Eradikationshofes bestimmt werden [119, 120]. Dabei repräsentiert der entstandene Hemmhof die bakteriostatische Wirkung und der Bereich völliger Eradikation den bakteriziden Effekt der aPDT. Die mittels eines Messschiebers ermittelten Größendurchmesser der gegen *S. saprophyticus* subsp. *bovis* (DSM 18669) gerichteten aPDT sind in Abbildung 29 dargestellt.



**Abbildung 29:** Ergebnisse der aPDT der mittels DSPC und DSPC:TEL hergestellten Wirkstoffträgersysteme auf *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* (DSM 18669). Die vollen Balken repräsentieren die bakterio-statische, die halbvollen Balken die bakterizide Wirkung auf die grampositiven Kokken.

Die fehlenden Hemm- und Eradikationshöfe bei nichtvorhandenem Wirkstoff zeigen, dass sowohl die Wirkstoffträgersysteme selbst als auch die Bestrahlung mittels LED keinen Effekt auf das Wachstumsverhalten der Mikroorganismen hatte. Es ist daher davon auszugehen, dass alle unter der Verwendung von MB auftretende Effekte auch auf die Freisetzung desselbigen zurückzuführen sind.

Deutlich ist zu erkennen, dass MB das Wachstumsverhalten des Bakteriums beeinflusst. Aufgrund seiner antibakteriellen Eigenschaften gegenüber grampositiven Bakterien, zeigt es auch ohne Bestrahlung eine bakterio-statische Wirkung. Unter der aPDT lässt sich nicht nur die bakterio-statische Wirkung verstärken, sondern ebenfalls eine deutliche bakterio-statische Wirkung erreichen. Ein Grund dafür liegt im unselektiven Wirkmechanismus der aPDT und dem daraus resultierenden Fehlen von spezifischen Zielstrukturen innerhalb der Mikroorganismen [42]. Wie bereits in Kapitel 1.4.1.1 beschrieben fußt der Wirkmechanismus der aPDT auf der Bildung von ROS, welche hauptsächlich die Zytoplasmamembran, aber auch die DNA schädigen.

Infolge dieser Schädigung kommt es zum Austritt von Zellbestandteilen aus dem Bakterium und zu dessen Absterben [67].

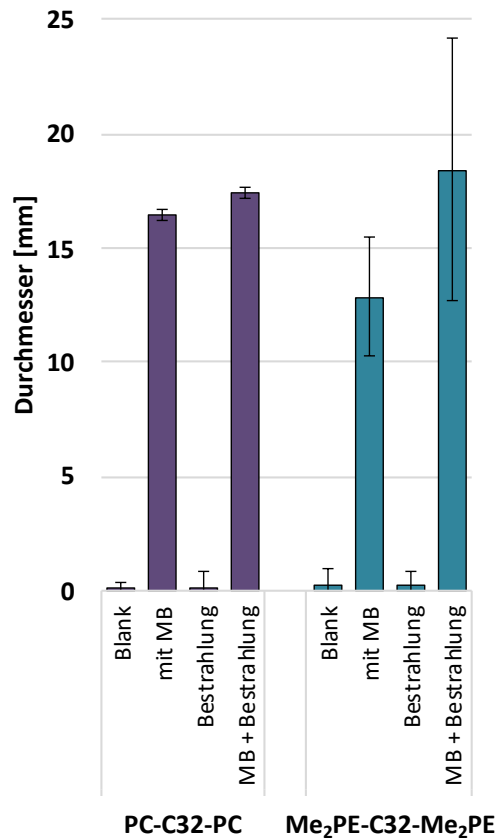
Sowohl die bakteriostatische als auch die bakterizide Wirkung gegenüber *S. saprophyticus* subsp. *bovis* (DSM 18669) sinkt bei den Trägersystemen mit enthaltenen TEL im Vergleich zum reinen DSPC-haltigen Trägersystem und der Kontrollgruppe mit Filterpapier leicht ab und kann mit dem Freisetzungsverhalten der DSPC:TEL-haltigen VPGs erklärt werden. Innerhalb der Inkubationszeit von 3 Stunden war im Freisetzungsprofil des VPG mit DSPC eine viel steilere Verlaufskurve sichtbar, die mit einer vermehrten Abgabe des MB einherging. Diese im Vergleich zu den DSPC:TEL-haltigen Wirkstoffträgersystemen schnellere Abgabe von größeren Mengen des Wirkstoffes führte zu einer früher einsetzenden Diffusion in den umgebenden Agar und somit auch zu einer früheren Aufnahme desselbigen durch die Mikroorganismen. Dieser zeitliche Vorsprung schlägt sich in einem leicht größeren Hemm- bzw. Eradikationshof im Vergleich zu den TEL-haltigen Systemen nieder.

#### **5.1.2. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus***

Wie zuvor die aus DSPC und DSPC:TEL hergestellten VPGs, wurde auch die Wirksamkeit der aPDT der mittels PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE hergestellten Aerocele gegenüber grampositiven Kokken getestet. Der ubiquitär in Wunden vorkommende Keim *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 25923) konnte im Šumperk Krankenhaus der Tschechischen Republik aus einem Patienten isoliert und bestimmt werden. Wie in Kapitel 2.6.4 beschrieben erfolgte die Evaluierung der bakteriostatischen Wirkung der mittels PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE hergestellten Aerocele vor Ort unter Einbezug des Agardiffusionstests und Größenmessung der entstandenen Hemmhöfe [119, 120].

Aus den Ergebnissen in Abbildung 30 wird deutlich, dass auch wie beim vorangegangenen Versuch mit *S. saprophyticus* subsp. *bovis* (DSM 18669) weder die Wirkstoffträgersysteme selbst noch die Bestrahlung einen Einfluss auf das Wachstum von *S. aureus* subsp. *aureus* (ATCC 25923) hatte.



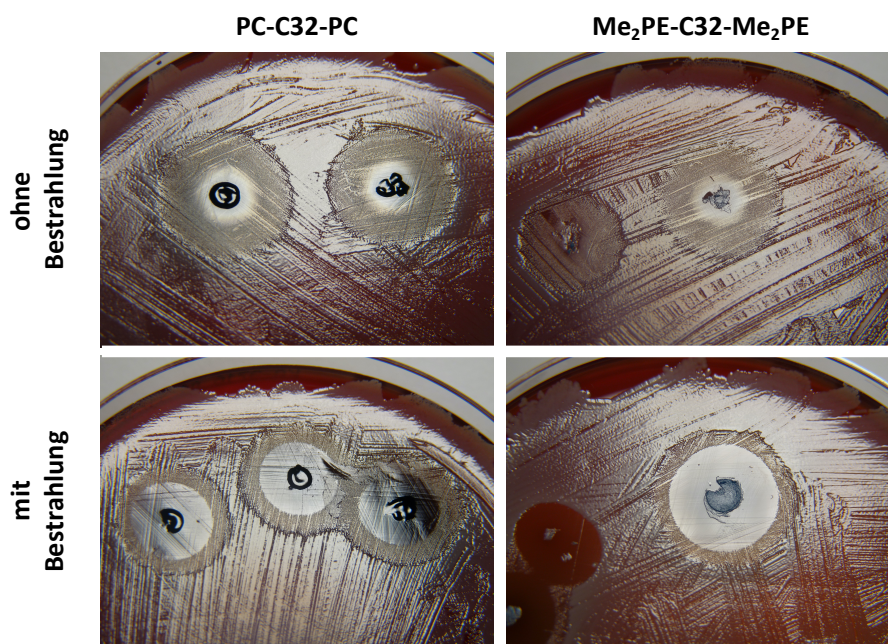


**Abbildung 30:** Ergebnisse der aPDT der mittels PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE hergestellten Wirkstoffträgersysteme auf *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 25923). Die vollen Balken repräsentieren die bakteriostatische Wirkung auf die grampositiven Kokken.

Analog zu den aus natürlichen Bolaamphiphilen hergestellten Wirkstoffträgersystemen zeigen auch die mit den synthetischen Vertretern hergestellten Aerogele sowohl ohne als auch unter der angewandten aPDT eine gute bakteriostatische Wirkung auf den grampositiven Keim. Ebenso wie bei den VPGs ist auch beim PC-C32-PC Aerogel der Unterschied von angewandter aPDT im Vergleich zur unbestrahlten Therapie mit MB nicht besonders groß, was durch die schnelle Hydratisierung des Trägersystems bei Kontakt mit der Agaroberfläche und die *in situ* Rückbildung des Hydrogels erklärbar ist. Aufgrund dieser Tatsache erfolgt die Freisetzung des Wirkstoffes in das umliegende Medium und die Bakterien kontinuierlich, ähnlich der Freisetzung des MB aus den VPGs. Anders verhält es sich beim Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE Aerogel, dessen Hemmhof unter angewandter aPDT zwar deutlich an Größe zunimmt aber dennoch auf gleichem Niveau wie der des PC-C32-PC Aerogels unter gleichen Versuchsbedingungen bleibt. Die Größe der Fehlerbalken des Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE Trägersystems sind ein Indikator für die uneinheitliche Größe der entstandenen Hemmhöfe. Dies hängt mit der Konsistenz des Aerogels zusammen, welches aufgrund seiner leichten und fragilen Struktur sowohl

schwierig aus seinem Gefäß zu entnehmen als auch auf dem mit Bakterien inokulierten Nährstoffboden zu applizieren war. Dieser Umstand resultierte in einer uneinheitlichen Größe des Aerogels so dass die Morphologie nicht wie beim PC-C32-PC Analogon einheitlich rund war und die Hemmhöfe sich nicht einheitlich radial bilden konnten.

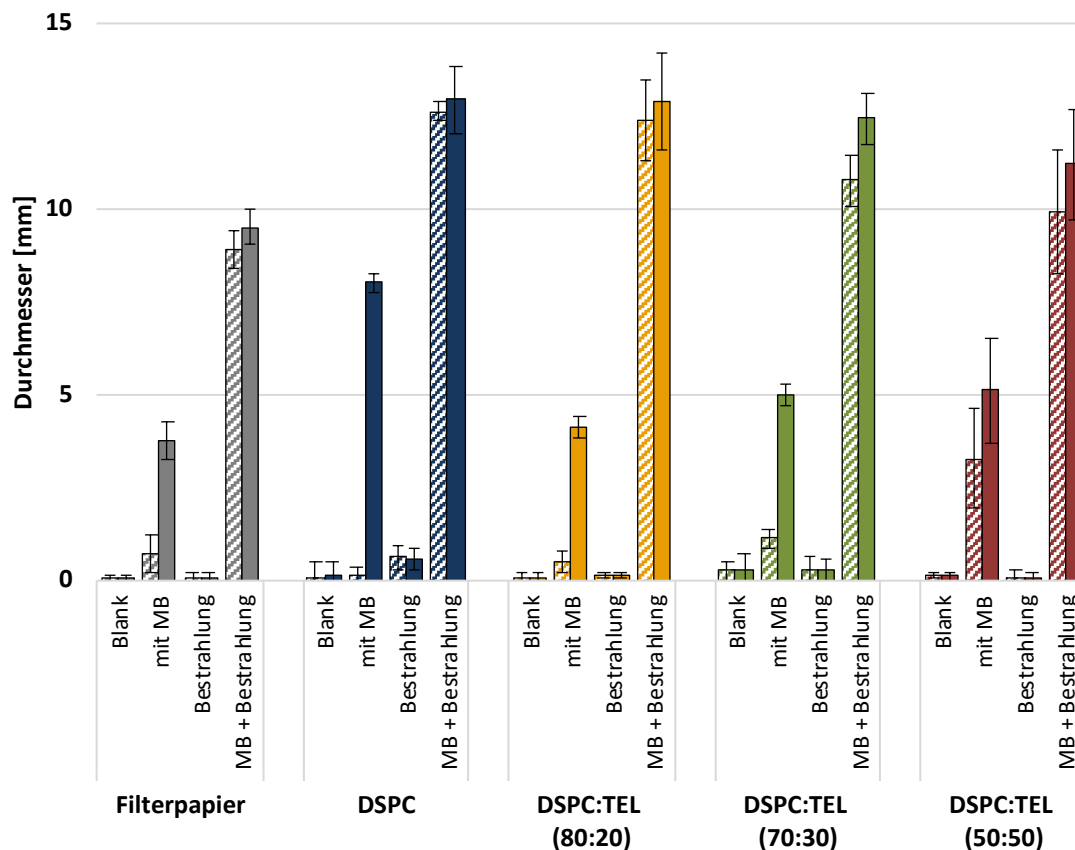
Die bakterizide Wirkung trat bei der Behandlung von *S. aureus* subsp. *aureus* (ATCC 25923) mit den aus synthetischen Bolaamphiphilen hergestellten Trägersystemen ebenfalls auf, jedoch wurden die Messdaten aus dem Sumperk Krankenhaus nicht quantitativ bestimmt und übermittelt. In Abbildung 31 ist dennoch deutlich erkennbar, dass bei angewandter aPDT die bakterizide Wirkung ähnlich wie bei der Therapie gegen *S. saprophyticus* subsp. *bovis* (DSM 18669) zunahm. Die ähnlich gute Wirkung der mit MB beladener Wirkstoffträgersysteme unter der aPDT gegen grampositive Keime gilt somit als naheliegend.



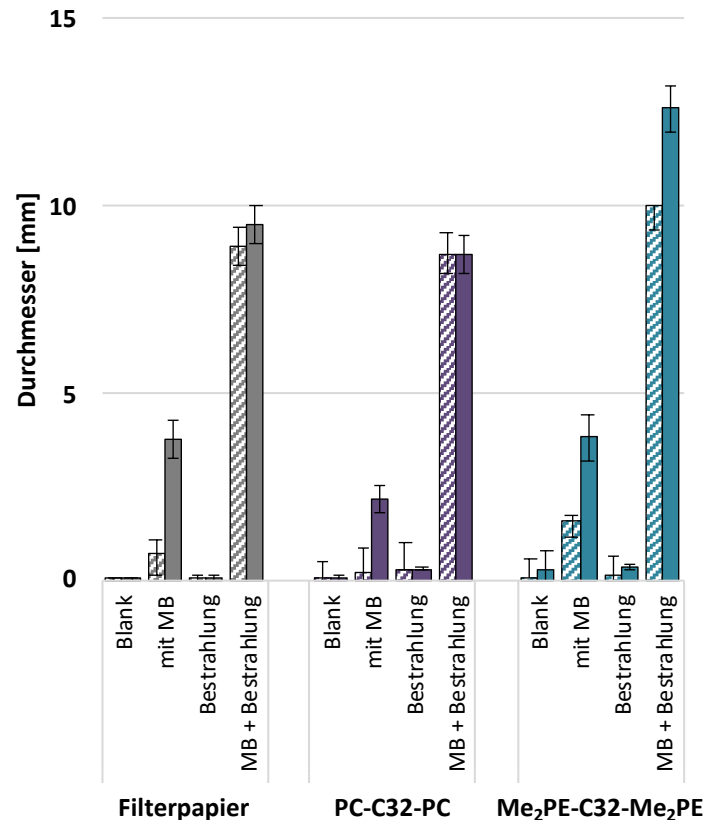
**Abbildung 31:** Ergebnisse der aPDT der mittels PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE hergestellten Wirkstoffträgersysteme mit enthaltenem MB auf *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 25923).

## 5.2. aPDT gegen gramnegative Bakterien

Neben *S. aureus* ist seltener auch *Escherichia coli* an Wundinfektionen beteiligt, daher fanden nachfolgend ebenso Versuche statt, um die Wirksamkeit der Trägersysteme an diesem Keim zu evaluieren [11]. Die Bestimmung der Hemm- und Eradikationshöfe im auf MH-Agar befindlichen *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) Rasen fand analog zum Versuchsaufbau des grampositiven Keims *S. saprophyticus* subsp. *bovis* (DSM 18669) statt (siehe Kapitel 2.6.3). Auch hier repräsentieren die entstandenen Hemmhöfe die bakteriostatische und die Eradikationshöfe die bakterizide Wirkung auf den Mikroorganismus. Die Ergebnisse der Größenmessungen beider Effekte sind in den Abbildungen 32 und 33 dargestellt.



**Abbildung 32:** Ergebnisse der aPDT der mittels DSPC und DSPC:TEL hergestellten Wirkstoffträgersysteme auf *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ). Die vollen Balken repräsentieren die bakteriostatische, die halbvollen Balken die bakterizide Wirkung auf die gramnegativen Stäbchen.



**Abbildung 33:** Ergebnisse der aPTT der mittels PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE hergestellten Wirkstoffträgersysteme auf *Escherichia coli* (DH5α). Die vollen Balken repräsentieren die bakteriostatische, die halbvollen Balken die bakterizide Wirkung auf die gramnegativen Stäbchen.

Genau wie bei den vorangegangenen Versuchen zeigten die hier verwendeten gramnegativen Bazillen keine Wachstumsänderungen unter der aPTT bei Abwesenheit von MB. Ebenso sind die Wirkstoffträgersysteme ohne eingearbeiteten Wirkstoff nicht in der Lage das Wachstum von *E. coli* (DH5α) zu hemmen.

Aufgrund seiner positiven Ladung ist MB in der Lage mit den sich an der äußeren Membran befindlichen Lipopolysacchariden (LPS) zu interagieren, die für die negative Ladung der Membran verantwortlich sind [52, 66]. In Abhängigkeit der Konzentration wurden jedoch MB-Aggregate an der Zytoplasmamembran beobachtet, die das Eindringen des Wirkstoffes behindern, da dieser nur als Monomer (einzeln vorliegendes MB-Molekül) die Membran passieren kann [46]. Durch diesen Effekt kann nur ein kleiner Teil des Wirkstoffes in die Mikroorganismen eindringen und diese abtöten was an den geringen Durchmessern der Eradikationshöfe ohne Bestrahlung erkennbar ist.

Alle mit MB beladenen Wirkstoffträgersysteme konnten mittels aPDT eine höhere Wirksamkeit zeigen, als die unbestrahlten Analoga. Sowohl extra- als auch intrazellulär akkumulierter PS ist in der Lage unter Lichteinfluss mit der Bildung von ROS zu reagieren, was zu einem höheren Effekt führt. Wie bereits mehrfach erläutert steht die Bildung von ROS im direkten Zusammenhang mit einer Schädigung der umliegenden biologischen Strukturen [35]. Durch die Anlagerung an der Zytoplasmamembran sind die Schäden an selbiger besonders hoch und es kommt schnell zum Austritt von Zellbestandteilen. Diesen Vorgang wiesen Khageswar Sahu *et al.* mithilfe von morphologischen Untersuchungen von *E. coli* unter dem Rasterkraftmikroskop bei *in vitro* angewandter aPDT bereits 2008 nach. Sie beobachteten bei ihrem Versuch, dass sich unter dem Einfluss des bestrahlten PS die Form des Keims änderte und die Größe gleichzeitig rasch abnahm [160].

Im Gegensatz zu den mit PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE hergestellten Aerogelen, konnten die VPGs mit DSPC und DSPC:TEL eine höhere Wirksamkeit erzielen, als die mit MB getränkten Referenzfilterpapierstücke. Dies scheint ein Hinweis auf eine erhöhte Aufnahmefähigkeit der Bakterien gegenüber dem Wirkstoff zu sein, denn die Arbeitsgruppe um Tayyaba Hasan fand in einer 2004 veröffentlichten Studie heraus, dass die Bindung von positiv geladenen PS an die äußere Membran von gramnegativen Bakterien eine Sättigungskonzentration erreichen konnte über der hinaus sich die Wirkung von zusätzlich appliziertem PS nicht mehr steigern ließ [41]. VPGs besitzen jedoch spezielle Freisetzungseigenschaften, die eine Erklärung für die gesteigerte Eradikation bieten. Wie bereits in Kapitel 4.1 erläutert kann die Freisetzung des Wirkstoffs aus VPGs entweder mehr durch die Abtragung der Arzneiform oder mehr durch Diffusion beeinflusst werden, wobei beide Prozesse gleichzeitig ablaufen. Bei der Ablösung lösen sich einzelne Vesikel vom Gesamtverband und setzen damit den in den Zwischenräumen befindlichen Wirkstoff frei, der als Initialdosis fungiert [149]. Die Vesikel selbst können nun mit der Membran der Bakterien interagieren und so lokal hohe Wirkstoffkonzentrationen bilden. Innerhalb der Vesikel liegt MB als Monomer vor, so dass es befähigt ist die Membran zu durchdringen [46]. Die zusätzlich stattfindende Fusion der Vesikel mit der Zytoplasmamembran erlaubt es mehr Wirkstoff in das Bakterium zu transportieren, was sich in einer höheren Sterberate widerspiegelt [161].

Die höhere Wirksamkeit der VPGs im Vergleich zu den mit synthetischen Bolaamphiphilen hergestellten Wirkstoffträgersystemen lässt sich so ebenfalls erklären. Aufgrund dessen, dass die Aerogele den Wirkstoff unverpackt aus dem

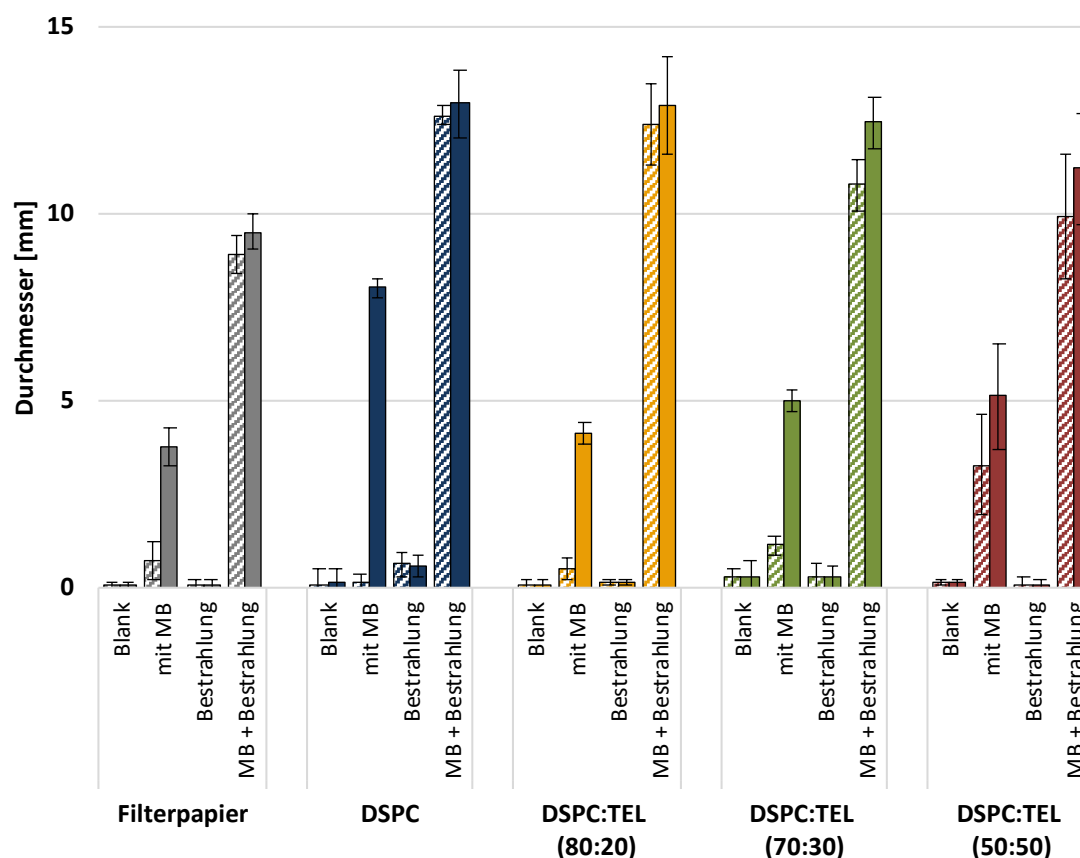
Trägersystem entlassen, ist keine gesteigerte Wirkung im Vergleich zu der Referenz möglich. Gleichzeitig ist die Wirksamkeit der mittels MB durchgeführten aPDT des Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE-haltigen Aerogels trotz höherer Freisetzungsrates vergleichend mit seinem Pendant nicht gestiegen. Dies bestätigt ebenfalls die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Tayyaba Hasan, die eine ausbleibende Wirkungssteigerung der aPDT bei Wirkstoffkonzentrationen über die Sättigungskonzentration der äußeren Membran hinaus postulierte [41].

Aufgrund der erhobenen Daten der MB-vermittelten aPDT an *S. saprophyticus* subsp. *bovis* (DSM 18669), *S. aureus* (ATCC 25923) und *E. coli* (DH5α) lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die Therapie an gramnegativen Keimen, trotz positiv geladenen Wirkstoffes und erleichterter Diffusion des Wirkstoffes in den Mikroorganismus, noch immer eine Herausforderung darstellt, jedoch ähnlich erfolgreich war wie die Therapie an grampositiven Bakterien.

## **6. *In vitro* Untersuchung der aPDT gegen Hefen – Ergebnisse und Diskussion**

Die oberflächliche Hautmykose ist weltweit ein zunehmendes Gesundheitsproblem, von dem sowohl immun kompetente, aber gehäuft immunsuppressive Patienten betroffen sind [23]. Insbesondere Hefen der Gattung *Candida* befallen Schleimhäute im Mund, aber auch den Magen-Darm-Trakt, sowie Schleimhäute im Urogenitalbereich [30]. Dabei gilt *C. albicans* als virulentester Vertreter [29]. Die Häufigkeit des Auftretens von arzneimittelresistenten Stämmen ist bei immunschwachen Personen wie Hochrisikogruppen, z.B. HIV- und Krebspatienten unter Chemotherapie aufgrund des langen Krankenhausaufenthaltes häufig erhöht, so dass neue Therapieansätze zunehmend an Bedeutung gewinnen [27]. Frühere Studien konnten bereits zeigen, dass die Anzahl an *C. albicans* Erregern durch die aPDT mit MB-Lösung reduziert werden konnte [58]. Da sowohl *C. albicans* als auch *Saccharomyces cerevisiae* derselben Gattung – Hefepilz – zugeordnet werden, wurden letztere als Modellkeim verwendet, um die Effektivität der aPDT mittels der in Kapiteln 2.1.2 und 2.2.2 hergestellten Wirkstoffträgersysteme zu untersuchen.

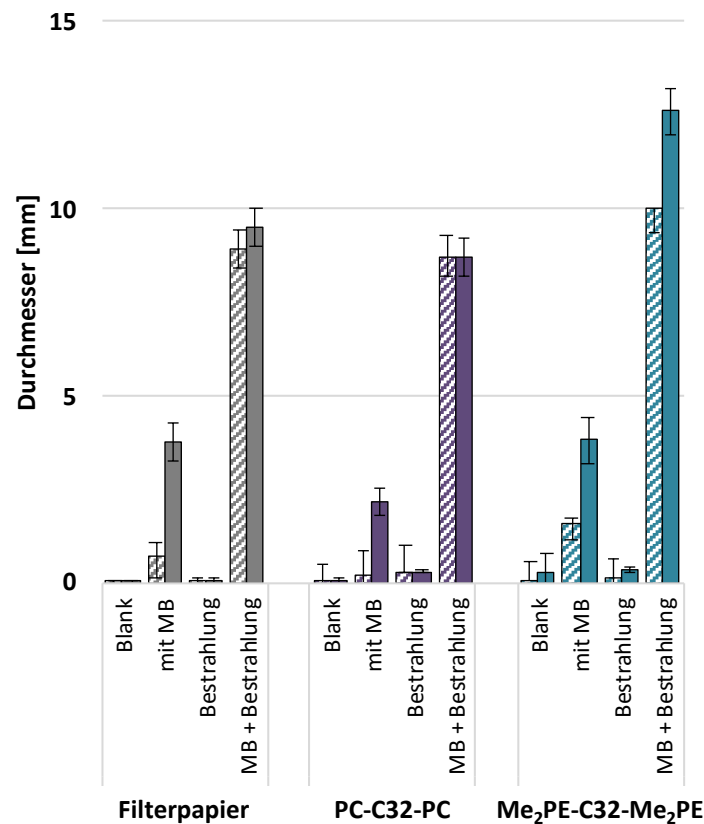
Wie in Kapitel 2.7 beschrieben, erfolgte die Beurteilung der aPDT-Wirkung an *S. cerevisiae* anhand der Größe der im Agar-Diffusions-Tests auftretenden Hemm- und Eradikationshöfe auf MH-Agar [119, 120]. Als Referenz dienten jeweils Wirkstoffträgersysteme ohne MB sowie Filterpapierkreise mit und ohne äquivalenter Menge Wirkstoff. Die mittels eines Messschiebers ermittelten Größendurchmesser der entstandenen Höfe sind in Abbildungen 34 und 35 graphisch dargestellt.



**Abbildung 34:** Ergebnisse der aPDT der mittels aus DSPC und DSPC:TEL hergestellten Wirkstoffträgersysteme auf *Saccharomyces cerevisiae*. Die vollen Balken repräsentieren die fungistatische und die halbvollen Balken die fungizide Wirkung auf die Hefezellen.

Anhand der fehlenden Hemmhöfe ist klar ersichtlich, dass die Bestrahlung selbst keinen Einfluss auf das Wachstum der Mikroorganismen hatte. Das Verhalten der natürlich vorkommenden bolaamphiphilen TEL und der beiden synthetischen Analoga aus PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>Pe auf das Wachstum von Mikroorganismen wurde bisher noch nicht untersucht. Frühere Studien des ähnlich den synthetischen Bolaamphiphilen aufgebauten Irlbacholins (PC-C22-PC) zeigten jedoch eine deutliche Wirksamkeit des Moleküls gegen Pilzinfektionen [162, 163]. Aufgrund dieser Tatsache war ein fungizider Effekt der Wirkstoffträgersysteme ohne

eingeschlossenen Wirkstoff denkbar, da aber bei allen Trägersystemen ohne MB und ohne Bestrahlung kein Hemmhof erkennbar war, blieb diese Annahme unbestätigt.



**Abbildung 35:** Ergebnisse der aPDT der mittels aus synthetischen Bolaamphiphilen hergestellten Wirkstoffträgersysteme auf *Saccharomyces cerevisiae*. Die vollen Balken repräsentieren die fungistatische und die halbvollen Balken die fungizide Wirkung auf die Hefezellen.

Die Aufnahme von positiv geladenen Wirkstoffen wie MB ist aufgrund des Membranaufbaus von Hefen begünstigt [27]. Weiterhin besitzt MB durch die Störung der mitochondrialen Funktion, sowie durch Störungen in der Membranhomöostase der Mikroorganismen, das Vermögen ohne durch Bestrahlung induzierte photodynamische Effekte das Wachstum von Hefen zu hemmen [57]. Diese beiden Tatsachen erklären die in Abwesenheit der Belichtung auftretenden Hemmhöfe bei allen Wirkstoffträgersystemen, die eine fungistatische Wirkung anzeigen. Gleichzeitig ist erkennbar, dass dieser fungistatische Effekt des MB sich mit angewandter aPDT steigern lässt und es zusätzlich zu einer fungiziden Wirkung kommt. Ein Grund dafür ist die im Vergleich zur zielgerichteten Störung von Stoffwechselvorgängen im Organismus der Zielzelle herrschende Unselektivität der aPDT. Die bei der aPDT entstehenden ROS zerstören innerhalb der Zelle u. a. Zellmembranen, Lysosomen und Mitochondrien, so dass durch die Vielzahl der Schäden in der Hefezelle und die



erhöhte Permeabilität der Zytoplasmamembran die Apoptose eingeleitet wird [27, 41, 43, 44, 45, 64, 68].

Mit Ausnahme des PC-C32-PC-haltigen Aerogels konnten alle mit MB beladenen Wirkstoffträgersysteme mittels aPDT eine höhere Wirksamkeit zeigen, als die Referenzlösung. Interessanterweise nahm sowohl bei den mit DSPC und mit zunehmendem Anteil TEL hergestellten VPGs, als auch bei den Wirkstoffträgersystemen mit PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE die fungizide Wirkung ohne Bestrahlung zu. Dies kann ein Hinweis auf eine durch die Trägersysteme vermittelte, erhöhte Aufnahmefähigkeit der Hefen gegenüber dem Wirkstoff und somit eine erhöhte Konzentration desselbigen sein. Eine Studie von M.C. Teichert *et al.* bestätigte 2002, dass die fungizide Wirkung der MB vermittelten aPDT ebenfalls dosisabhängig ist [164].

Während die mit DSPC und TEL hergestellten VPGs unter der aPDT keine großen Unterschiede in ihrer fungistatischen Wirkung untereinander aufwiesen, verhielt es sich bei den aus PC-C32-PC und Me<sub>3</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE hergestellten Aerogelen anders. Der von Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE unter Lichteinfluss erzeugte Hemmhof war etwa 40 mm größer, als der von PC-C32-PC bei gleichen Versuchsbedingungen. Eine mögliche Erklärung bieten das unterschiedliche Hydratisierungsverhalten und die Freisetzungsprofile beider Aerogele. Während das PC-C32-PC enthaltene System eine sofort auftretende Hydratisierung bei Kontakt mit der Agaroberfläche zeigte, blieb das Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE-haltige Aerogel in seiner Morphologie unverändert. Der Wirkstoff im *in situ* generierten PC-C32-PC Hydrogel war nun an der Diffusion in den Agar gehindert. Dies ist ebenfalls anhand des kleineren Wirkungsradius des PC-C32-PC-haltigen Systems im Vergleich zum mit MB getränkten Filterpapier erkennbar. Das an der Oberfläche des Lipidgerüsts befindliche MB im Aerogel aus Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE diffundierte aufgrund des im Freisetzungsprofil gezeigten „burst release“ hingegen sehr schnell in den Agar. Weiterhin ist im Freisetzungsprofil ersichtlich, dass das betreffende Aerogel bereits nach etwa sechs Stunden komplett entladen war. Im vorliegenden Versuch fand die Bestrahlung nach einer Inkubationszeit von drei Stunden statt, so dass zu diesem Zeitpunkt aus dem Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE-haltigen Aerogel bereits 30 % mehr Wirkstoff freigesetzt wurde, als beim PC-C32-PC-haltigen Analogon.

Im direkten Vergleich zur aPDT gegenüber Bakterien fällt auf, dass Hefen zumindest gegenüber grampositiven Bakterien wie *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* (DSM

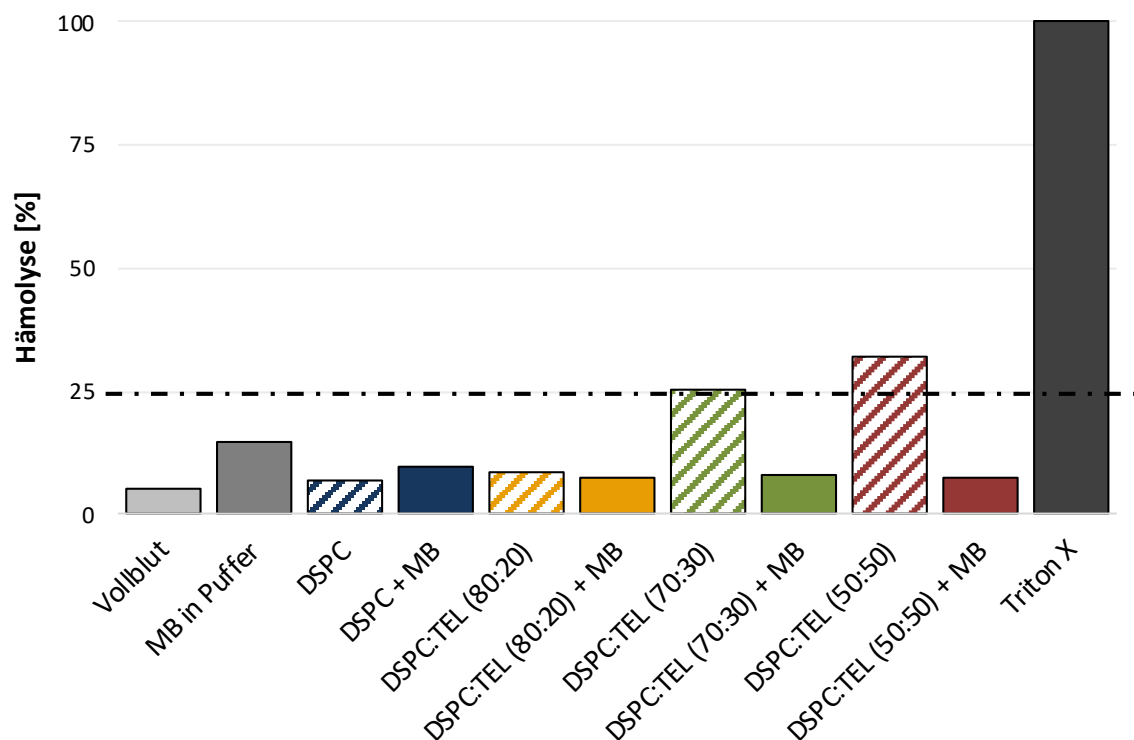
18669) und *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 25923) weniger anfällig zu sein scheinen. Eine mögliche Erklärung bietet der Größenunterschied zwischen Bakterien- und Hefezellen. Hefezellen sind etwa 25- bis 50-mal größer als Bakterien und besitzen dementsprechend ein höheres Zellvolumen [27, 44]. Weiterhin besitzen eukaryotische Zellen mehrere von Membranen umgebenden, geschützten Organellen im Gegensatz zu den ungeschützten Zielstrukturen in prokaryotischen Zellen. Daher ist es logisch, dass bei Bakterien bereits ein einziger durch ROS vermittelter Schaden ausreicht, um den Zelltod auszulösen, während in Hefezellen mehrere Organellen beschädigt werden müssen, um die Apoptose einzuleiten [27, 44].

## **7. Ex vivo Untersuchung der Hämokompatibilität – Ergebnisse und Diskussion**

Schleimhäute sowie das Wundbett sind Applikationsorte, an denen Blutgefäße in direkter Nachbarschaft vorhanden sind und die Barriere zum Blutkreislauf oft leicht durchtreten werden kann. Weiterhin können Mikroorganismen wie beispielsweise *Staphylococcus aureus* durch Endotoxine Hämolyse induzieren, die lokal mit einer vermehrten Anzahl von Blutbestandteilen einhergeht [3]. Möchte man ein Wirkstoffträgersystem einsetzen, um auf Schleimhäuten oder innerhalb einer Wunde zu therapieren, so ist es nicht nur wichtig, dass dieses die Integrität des Gewebes nicht verletzt, sondern ebenfalls bei Kontakt mit Blutbestandteilen keinen Nachteil für den Patienten darstellt. Obwohl in früheren Studien festgestellt werden konnte, dass reine TEL sowohl für den tierischen als auch für den menschlichen Organismus untoxisch sind, können manche Phospholipide dennoch Risiken bergen. Zudem sind neben den Bestandteilen der Trägersysteme selbst auch manche Wirkstoffe problematisch für die Verträglichkeit [82, 91]. So ist beispielsweise von MB bekannt, dass es bei therapeutischen i. v. Dosen von 7 mg/kg Körpergewicht in der Lage ist Hämolyse zu verursachen [48]. Die *in vitro* Untersuchung des Kontaktes zwischen Blutbestandteilen, wie beispielsweise Erythrozyten, und den Wirkstoffträgersystemen, sowie dem enthaltenen Wirkstoff ist daher ein wichtiger Zwischenschritt zur späteren Anwendung am Patienten.

Die Untersuchung des potentiellen Vermögens von DSPC:TEL-haltigen Wirkstoffträgersystemen Erythrozyten zu schädigen fand wie unter 2.8 beschrieben mit Hilfe des Hämolyse-Assays statt. Dieser Versuch konnte aufgrund des geringen

Probenvolumens von 10  $\mu\text{L}$  nicht mit den Aerogelen aus PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE durchgeführt werden. Der Begriff Hämolyse kommt aus dem altgriechischen von haíma (Blut) und lýsis (Auflösung) und ist definiert als Veränderung, Auflösung oder Zerstörung der Erythrozytenmembran [165]. Das in der Folge freigesetzte Hämoglobin in das umliegende Plasma hat wiederum Effekte auf den Organismus, die von einer Reizung umliegender Blutgefäße bis zum akutem Nierenversagen reichen können [166]. Beim Hämolyse-Assay handelt es sich um eine quantitative Messung des Oxyhämoglobins, welches aus den aus Erythrozyten austretenden Hämoglobin beim Kontakt mit Sauerstoff gebildet wird [167]. Das entstandene Oxyhämoglobin kann bei 540 nm mittels Spektrometer gemessen werden. Als Negativkontrolle diente physiologische Kochsalzlösung (0 % Hämolyse); als Positivkontrolle konnte eine 1 %ige Triton X-100® Lösung herangezogen werden. Da dieses die Erythrozyten vollständig lysiert wurde der gemessene Wert als 100 % gleichgesetzt [165]. Als weitere Negativkontrolle fungierte unbehandeltes Vollblut. Der Definition von Ketan Amin *et al.* folgend, sind Hämolysewerte unter 10 % als unbedenklich einzustufen, während Werte über 25 % als hämolytisch angesehen werden müssen [167]. Die Ergebnisse des durchgeführten Hämolyse-Assays sind in Abbildung 36 dargestellt.



**Abbildung 36:** Ergebnisse des Hämolyse-Assays.

Unauffällig ist das hämolytische Verhalten des in PBS-Puffer gelösten MB, so dass davon auszugehen ist, dass die für die Therapie eingesetzte Konzentration für den menschlichen Organismus unbedenklich ist. Ebenfalls unbedenklich für die Integrität der Erythrozyten sind die Wirkstoffträgersysteme aus DSPC und DSPC:TEL (80:20), jedoch ist erkennbar, dass mit wachsenden Anteilen an TEL das hämolytische Potential und somit die Unverträglichkeit auf den menschlichen Organismus steigt. Ein Grund dafür liegt sicherlich in der Verwendung des GLE für die Herstellung der Trägersysteme begründet, der aufgrund seiner Gewinnung aus der gefriergetrockneten Biomasse des Organismus *Sulfolobus acidocaldarius* Verunreinigungen enthält, die u. a. auch für die gelblich-bräunliche Färbung der VPGs verantwortlich ist (siehe dazu Kapitel 3.1.1).

Im Gegensatz dazu scheinen alle mit MB versetzten Trägersysteme keinen Einfluss auf die Erythrozyten zu zeigen. Erklären lässt sich dieses Phänomen mit der Messung des beim Austritt aus den Erythrozyten gebildeten Oxyhämoglobins aus der Reaktion von Hämoglobin bei Kontakt mit Sauerstoff. In Studien konnte gezeigt werden, dass MB in sehr geringen Blutkonzentrationen selbst als Antioxidans wirken kann [49]. Weitergehende Untersuchungen stellten fest, dass es dabei mit eisenhaltigen Enzymen um Sauerstoff konkurriert und so die Oxidation von selbigen verhindert [48]. Bedingt durch diese Erkenntnisse ist daher anzunehmen, dass MB eine protektive Wirkung auf die Oxidation des eisenhaltigen Hämoglobins zu Oxyhämoglobin einnimmt. Demnach können die gemessenen Oxyhämoglobin-Werte aus den Blutproben mit den Wirkstoffträgersysteme aus DSPC:TEL (70:30) und DSPC:TEL (50:50) mit enthaltenem MB nicht für die abschließende Beurteilung des hämolytischen Potentials der Arzneiform herangezogen werden.

Nach den Untersuchungen auf das mögliche Hämolysepotential der Wirkstoffträgersysteme ist daher abschließend festzustellen, dass sowohl die in den aPDT Untersuchungen an Mikroorganismen eingesetzte MB-Konzentration als auch die Trägersysteme aus DSPC und DSPC:TEL (80:20) selbst unbedenklich sind, so dass insgesamt die Therapie vielversprechend zu sein scheint.

## **8. Untersuchung der Verträglichkeit *in ovo* – Ergebnisse und Diskussion**

Die aPDT ist eine Therapie, die sowohl zur Behandlung von Haut-, Weichteil- als auch von Schleimhautinfektionen geeignet ist, so dass das eingesetzte Wirkstoffträgersystem eine gute Biokompatibilität auf selbigen aufweisen sollte. Wie eingangs erläutert stellt die präklinische Untersuchung der Biokompatibilität von Wirkstoffträgersystemen am Hühnerembryo eine unkomplizierte, wirtschaftliche und schnelle Alternative zu Säugetierversuchen dar. Die leicht zugängliche, durchsichtige Chorioallantois-Membran (CAM) erlaubt es Gefäßveränderungen in Echtzeit zu beobachten und zu bewerten [168]. Weiterhin zeigten Studien, dass die an der CAM erhaltenen Daten mit denen in Säugetiermodellen vergleichbar sind [124].

Vor den Experimenten wurde die CAM wie unter 2.9.1 beschrieben freigelegt und die Vitalität der Embryonen sichergestellt. Ebenfalls fand eine Beurteilung der Beschaffenheit der Blutgefäße und das Fehlen von morphologischen Veränderungen statt, um eine Vorschädigung auszuschließen.

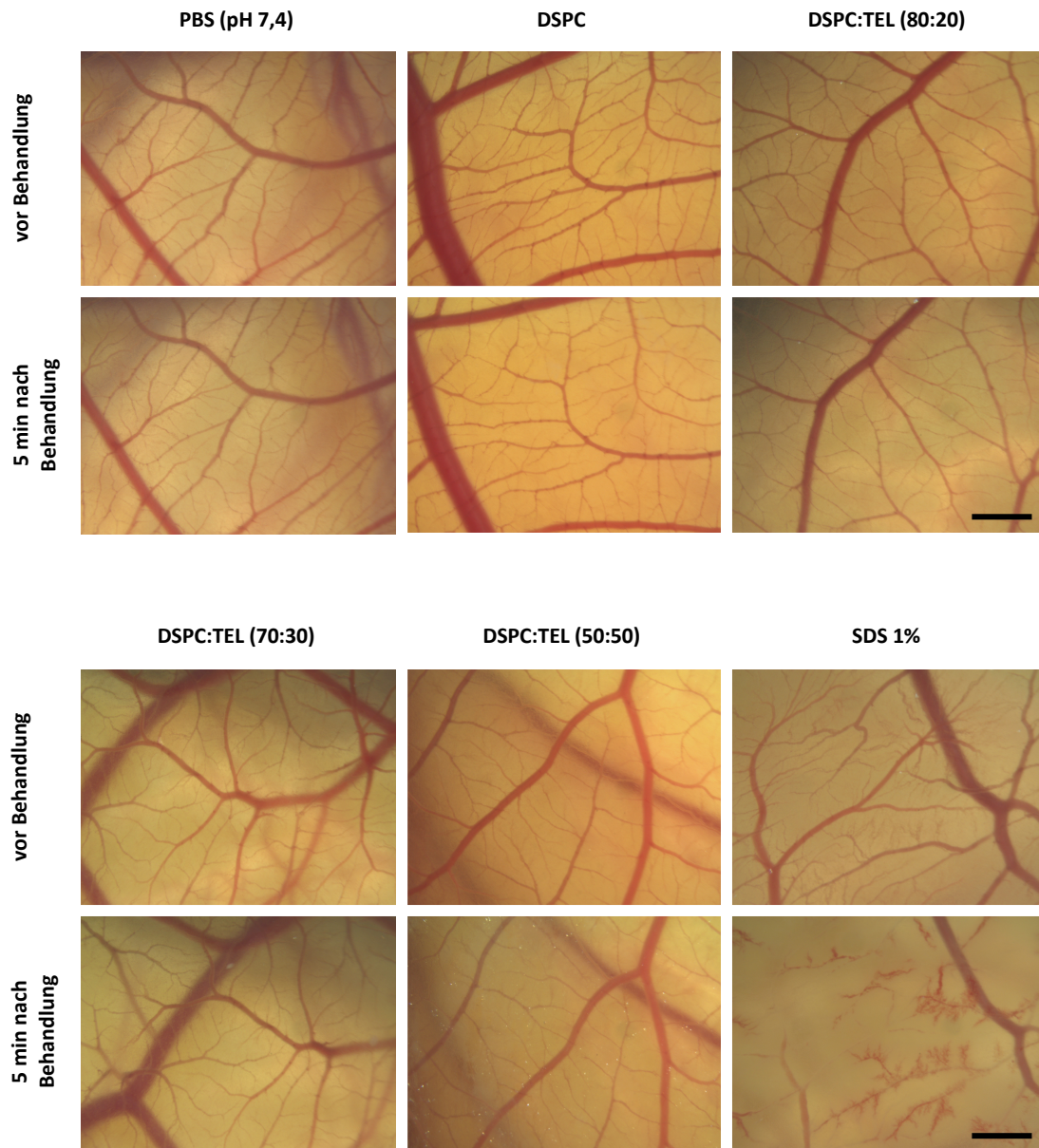
### **8.1. Schleimhautverträglichkeit der Wirkstoffträgersysteme**

In Bezug auf die topische Toxizitätsbewertung von Wirkstoffträgersystemen sieht die ISO 10993-10 vor diese ohne durchgeführte Tierversuche als potenzielle Reizstoffe für Haut- und Schleimhaut einzustufen, so dass ein Test auf Verträglichkeit für eine spätere Anwendung am Patienten unumgänglich ist [169]. Da die CAM in ihrem Aufbau dem von Schleimhäuten ähnelt und auf eine durch die Substanz verursachte Verletzung ähnlich reagiert wie das Bindegewebe des Kaninchenauges, ist der *in vitro* „henn’s egg test on the chorioallantoic membrane“ (HET-CAM) als Alternative zum in ISO 10993-10 geforderten *in vivo* Draize-Kaninchen Test wissenschaftlich anerkannt [126, 127].

Die Schleimhautverträglichkeit aller mit Bolaamphiphilen hergestellten Hydrogele wurden daher unter Verwendung des HET-CAM wie in 2.9.2 beschrieben durchgeführt. Als Negativkontrolle diente bereits zur Herstellung der aus synthetischen Bolaamphiphilen genutzte isotonische Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %) sowie für die Herstellung der aus DSPC und DSPC:TEL herangezogener PBS-Puffer (pH 7,4). Für die Positivkontrolle wurde 1 %ige (m/m) Sodiumdodecylsulfat-Lösung (SDS 1 %) verwendet. Des Weiteren wurde das in Anlehnung an das NRF 25.3

hergestellte HEC 300 Hydrogel als Referenz herangezogen, da es aufgrund seiner Verwendung als Vaginalgel bereits für die Anwendung auf Schleimhäuten zugelassen ist [115].

Während des Experiments wurde das Auftreten von Blutungen, Thromben und Gefäßlyse überwacht und der Reizwert (IS, engl. „Irritation Score“) bestimmt. Die in Abbildung 37 und 38 gezeigten Ergebnisse des durchgeführten HET-CAM zeigen eine deutliche Gefäßveränderung durch die Behandlung mit 1 %iger SDS-Lösung (m/m). Diese resultieren in einem IS von 18,7 was mit der Bewertung einer „starker Reizung“ und der in der Literatur angeführten Angaben korreliert [116, 128].

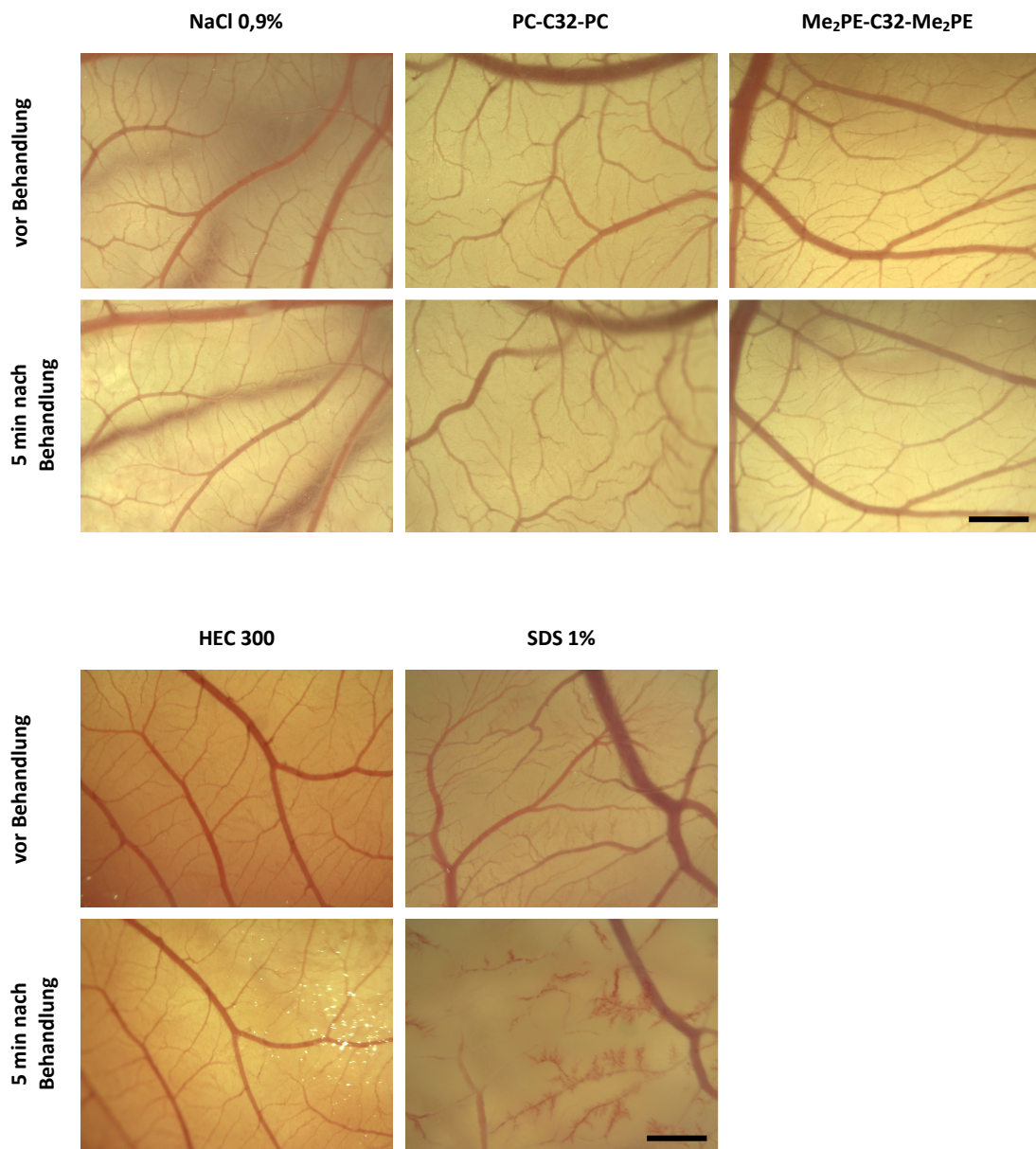


**Abbildung 37:** Stereomikroskopische Aufnahmen der CAM Oberfläche bei 13-facher Vergrößerung am 10. Tag der embryonalen Entwicklung vor und 5 Minuten (min) nach der Behandlung mit DSPC sowie DSPC:TEL verschiedener Massenverhältnissen. PBS-Puffer (pH 7,4) und SDS 1% (m/m) dienten als Referenz. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm.

Da die aus natürlichen Bolaamphiphilen hergestellten Wirkstoffträgersysteme eine deutliche Färbung aufwiesen, wurde der HET-CAM wie in Kapitel 2.9.2 beschrieben modifiziert, indem nicht nur die Reaktion der CAM in der festgelegten Zeit von fünf Minuten beobachtet wurde, sondern im Anschluss ein zweistufiger Waschungsschritt mit physiologischer Kochsalzlösung erfolgte um die Gefäße unter dem Wirkstoffträgersystem zu beurteilen. Die Ergebnisse in Abbildung 37 zeigen die abgewaschene CAM Oberfläche nach fünf Minuten Exposition der Trägersysteme. Analog zu dem für die Herstellung herangezogenen PBS-Puffers wiesen alle



Wirkstoffträgersysteme einen IS von 0 auf und sind somit als „praktisch nicht reizend“ auf Schleimhäuten zu bewerten.



**Abbildung 38:** Stereomikroskopische Aufnahmen der CAM Oberfläche bei 13-facher Vergrößerung an EDD 10 vor und 5 Minuten (min) nach der Behandlung mit PC-C32-PC, Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE und HEC 300 Hydrogel. NaCl 0,9% und SDS 1% (m/m) dienen als Referenz. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm.

Abbildung 38 zeigt die Ergebnisse der aus PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE hergestellten Hydrogele. Aufgrund der in Kapitel 3.2.1. beschriebenen rheologischen Eigenschaften waren beide Systeme sehr leicht auf der CAM Oberfläche aufzubringen, da sie bei geringer Scherbelastung schnell verflüssigten. Genau wie bei der als Referenz herangezogenen physiologischen Kochsalzlösung war auch bei ihnen

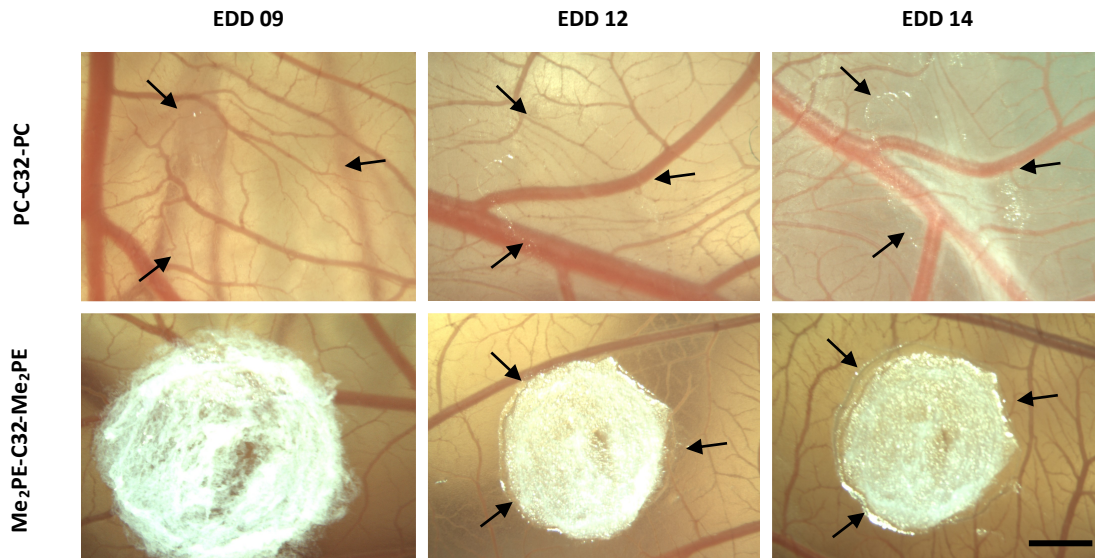


„praktisch kein Reizpotential“ (IS 0) festzustellen. Anders als Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE zeigte das PC-C32-PC Bolaamphiphil eine mit fortschreitender Zeit erhöhte Festigkeit des auf der CAM-Oberfläche applizierten Hydrogels. Die daraufhin eintretende, weißliche Opaleszenz und die Viskositätszunahme hatten keinen Einfluss auf die Gefäße der CAM. Der Umstand, der leichten Anwendbarkeit des PC-C32-PC Hydrogels zum einen und der innerhalb weniger Minuten eintretenden Festigkeit bei annähernd herrschender Körpertemperatur macht es für den möglichen Einsatz als Wirkstoffträgersystem besonders interessant.

## **8.2. Langzeitverträglichkeit der Aerogele**

Aerogele als Wundauflagen, oder als Wirkstoffträgersysteme verbleiben mehrere Tage in der Wunde des Patienten [20]. Aufgrund dessen ist es unabdinglich, dass sie auch über einen längeren Zeitraum eine hohe Biokompatibilität aufweisen. Unter Biokompatibilität wird die Eigenschaft eines Materials beschrieben, seine Funktion im Rahmen einer angemessenen Wirtsreaktion zu erfüllen. Hierzu zählt auch, dass das applizierte Material keine direkten Zellschäden, Abwehrreaktionen oder Irritation in seiner direkten Umgebung auslöst oder es zu einer Sensibilisierung des umliegenden Gewebes kommt [170]. Wie in Kapitel 2.9.3 beschrieben wurde die ursprünglich von Domenico Ribatti *et al.* entwickelte Methode zur Evaluierung der Angiogenese (vermehrte Neubildung von Blutgefäßen) modifiziert und für die Untersuchung der Langzeitverträglichkeit, der mit PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE hergestellten Aerogele auf der CAM Oberfläche entsprechend adaptiert [168].

Beginnend mit dem 9. Tag der embryonalen Entwicklung (EDD, engl. embryo development day) dienten das Auftreten von Blutungen, Gefäßlyse, extra- oder intravaskuläre Koagulation sowie vermehrte Angiogenesevorgänge rund um das Trägersystem als Marker für eine Unverträglichkeit. Bis einschließlich EDD 14 erfolgte eine tägliche Beobachtung, sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch. Die während der Beobachtungszeit entstandenen Aufnahmen unter dem Stereolichtmikroskop sind in Abbildung 39 aufgeführt.



**Abbildung 39:** Stereomikroskopische Aufnahmen der CAM Oberfläche bei 13-facher Vergrößerung an verschiedenen Tagen der embryonalen Entwicklung. Die Pfeile markieren die Hydratisierung des PC-C32-PC- und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE-haltigen Aerogels. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm.

Während der Hydratisierung von Aerogelen kann es aufgrund des damit verbundenen osmotischen Drucks auf die Gefäße zu Beschädigungen des Kapillarplexus kommen. Wie in Abbildung 39 zu erkennen, zeigen die PC-C32-PC- und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE-haltigen Aerogele keinerlei Symptome einer Unverträglichkeit. Weiterhin ist deutlich zu sehen, dass das PC-C32-PC-haltige Aerogel unmittelbar nach Kontakt mit der CAM Oberfläche vollständig hydratisiert, während das Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE Analogon mehrere Tage benötigt. Der sich vom Rand des Trägersystems ausbreitende Hydratisierungsprozess ist durch Pfeile gekennzeichnet. Erklären lässt sich die unterschiedlich schnelle Ausbildung des Hydrogels erneut mit der durch Wasserstoffbrückenbindung hervorgerufene stabilisierende Effekte der Me<sub>2</sub>PE-Kopfgruppe des Bolaamphiphiles auf die sich im Hydrogel formenden Nanofasern. Aufgrund dessen können weniger Wasserstoffbrückenbindungen mit der umgebenden Flüssigkeit gebildet werden, als beim PC-C32-PC-haltigen Aerogel.

### 8.3. Verträglichkeit der photodynamischen Therapie

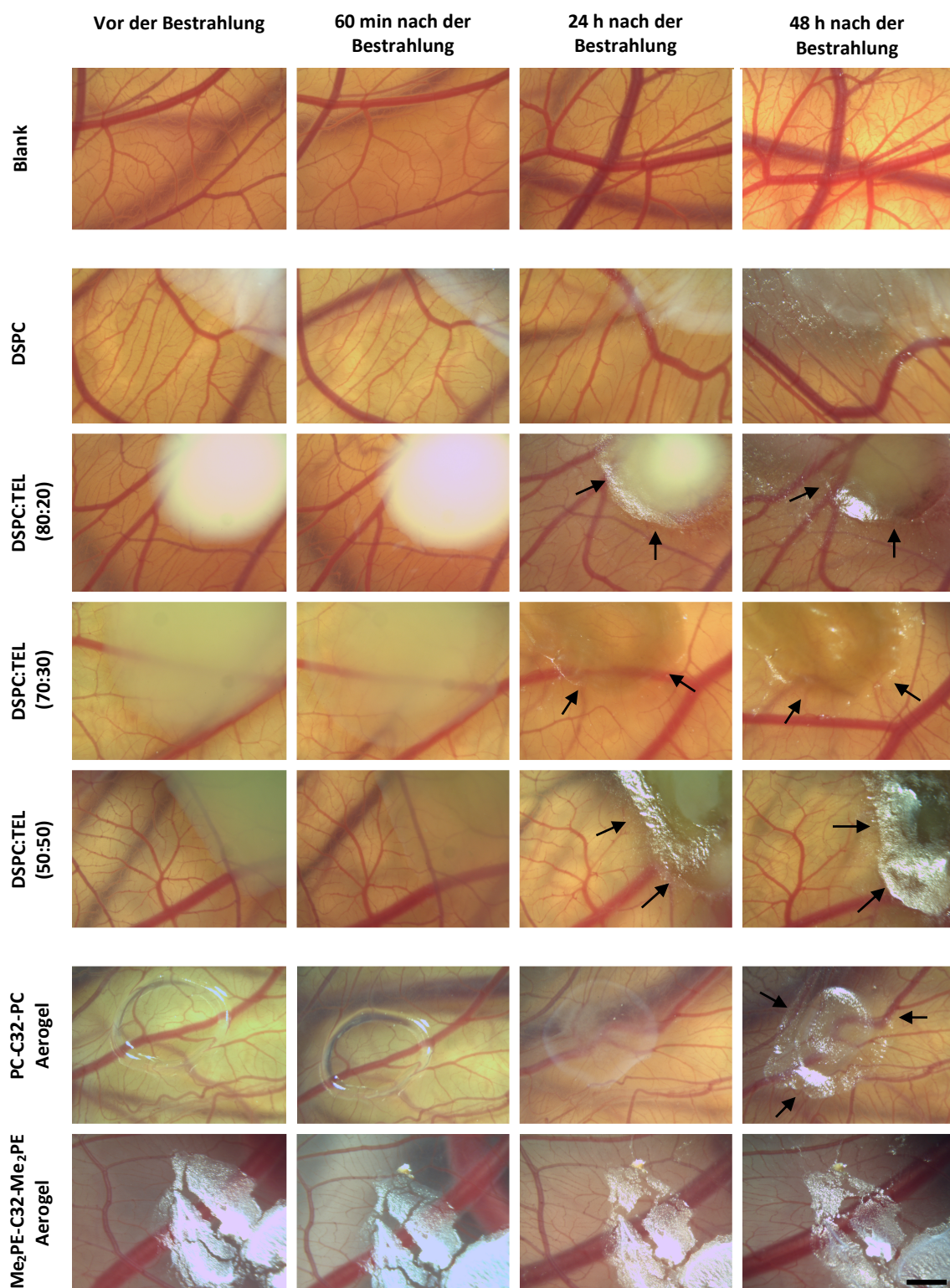
Nebenwirkungen der PDT können neben einer länger andauernden Photosensitivität der Haut auch Schädigungen an gesundem Gewebe sein. Bedingt durch die geringe Selektivität der verwendeten PDT kann es nicht nur zu einer Schädigung der Mikroorganismen, sondern ebenfalls zu einer Zerstörung von Endothelzellen

innerhalb des bestrahlten Bereiches kommen. Gelangt der PS in das Gefäßsystem so kann er in den Endothelzellen, die die Blutgefäße auskleiden durch die bei der Bestrahlung gebildeten ROS Schäden am Zytoskelett induzieren, die in einer Änderung der Morphologie der Zelle resultieren. Aufgrund dessen werden die Zell-Zell-Verbindungen (sog. tight-junctions) zerstört und es kommt zu einer erhöhten Zellpermeabilität, die einerseits zu Blutungen (Hämorrhagien), aber andererseits auch zur Freisetzung von Gerinnungsfaktoren (wie u. a. den von Willebrand-Faktor – vWF) führt, welche die Thrombozytenaggregation aktivieren. Durch die Aktivierung der Gerinnungskaskade kommt es zu lokalen Thrombosen und somit zum Gefäßverschluss, der für die Unterversorgung des betroffenen Bereiches mit Blut verantwortlich ist [171]. Des Weiteren ist eine durch die PDT vermittelte, lokale Entzündungsreaktion möglich, die auf der CAM als morphologische Veränderungen des zwischen den Epithelschichten liegenden Gewebes sichtbar wird [124].

Die Untersuchung der Biokompatibilität von Wirkstoffträgersystemen auf der CAM ist bereits in der Literatur beschrieben worden [121]. 2018 gelang es unter der Mitwirkung von Nikola Plenagl eine Methode zur Beurteilung der photodynamischen Aktivität eines PS gegenüber Bakterien am Hühnerembryomodel zu entwickeln [172]. Im nachfolgenden Versuch fand die Untersuchung der Schleimhautverträglichkeit der aPDT an der CAM statt, um die Nutzbarkeit der hergestellten Wirkstoffträgersysteme für ihren Einsatz auf Schleimhäuten oder im Wundbett zu bewerten.

Zu Beginn des Versuches an EDD 12 wurde sichergestellt, dass die Bestrahlung keinen Einfluss auf die Morphologie der Blutgefäße hatte („Blank“; Abbildung 40 Seite 92). Da die CAM keine Veränderungen aufwies, konnten Proben eines jeden Wirkstoffträgersystems (mit und ohne eingeschlossenem MB) auf die CAM aufgebracht werden. Nach einer dreistündigen Inkubationszeit erfolgte die Bestrahlung mittels LED-Leuchte (26,88 J/cm<sup>2</sup> Fluenz). Die Beurteilung der Gefäßveränderungen fand direkt im Anschluss an die Bestrahlung, und ergänzend nach 10, 20, 40 und 60 Minuten (min) sowie nach 24 bzw. 48 Stunden (h) statt.

In Abbildung 40 sind die stereomikroskopischen Aufnahmen der auf der CAM aufgetragenen Wirkstoffträgersysteme aus i) DSPC und DSPC mit verschiedenen Massenanteilen TEL sowie ii) die mittels PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE hergestellten Aerogele vergleichend mit der Blankprobe (LED ohne Trägersystem) dargestellt.



**Abbildung 40:** Stereomikroskopische Aufnahmen der CAM Oberfläche bei 13-facher Vergrößerung an verschiedenen Zeitpunkten der angewandten, LED-vermittelten PDT unter Anwendung von DSPC- und DSPC:TEL-haltigen VPGs und aus synthetischen Bolaamphiphilen hergestellten Aerogelen im Vergleich zur PDT ohne Wirkstoffträgersysteme (Blank). Die Pfeile zeigen die beginnende Trocknung der Wirkstoffträgersysteme, die durch Reflektion des einfallenden Lichtes sichtbar ist. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm.

Betrachtet man zunächst die mit DSPC und DSPC:TEL hergestellten VPGs (i), so ist deutlich, dass mit steigenden Massenanteilen TEL die Wirkstoffträgersysteme dunkler werden, was auf die enthaltenen Verunreinigungen starke Färbung des GLE zurückzuführen ist (siehe dazu Kapitel 3.1). Alle Wirkstoffträgersysteme ließen sich leicht auf der CAM applizieren und nahmen dort innerhalb der dreistündigen Inkubationszeit wieder einen halbfesten Zustand an, so dass eine lokale Therapie aufgrund der Haftungs-eigenschaften an der Endothelzellschicht einfach umzusetzen war [144]. Über den gesamten Beobachtungszeitraum von 48 Stunden nahmen die Wirkstoffträgersysteme zwar an Umfang ab, blieben aber am Applikationsort bestehen. Alle mit TEL hergestellten VPGs zeigen 24 Stunden nach der Bestrahlung eine beginnende Trocknung am Rand des Gels, die sich bis zum Endpunkt des Versuches zwar fortsetzte, aber keinen Einfluss auf die Integrität der Blutgefäße nahm (in Abbildung 40 durch Pfeile gekennzeichnet). Ein verstärkender Einfluss auf diesen Effekt kann in der langen Versuchsdauer außerhalb des klimatisierten und feuchtigkeitsregulierenden Brutschrankes, sowie in der Wärmeentwicklung bei der 20-minütigen Bestrahlung sein, die eine erhöhte Verdunstung der inneren Phase zur Folge hatte. Die gesammelten Ergebnisse lassen insgesamt betrachtet aber den Schluss zu, dass alle verwendeten Wirkstoffträgersysteme über 48 Stunden sowohl Schleimhautkompatibel sind, als auch ohne eingeschlossenen Wirkstoff keinen Einfluss auf die Integrität der Blutgefäße haben.

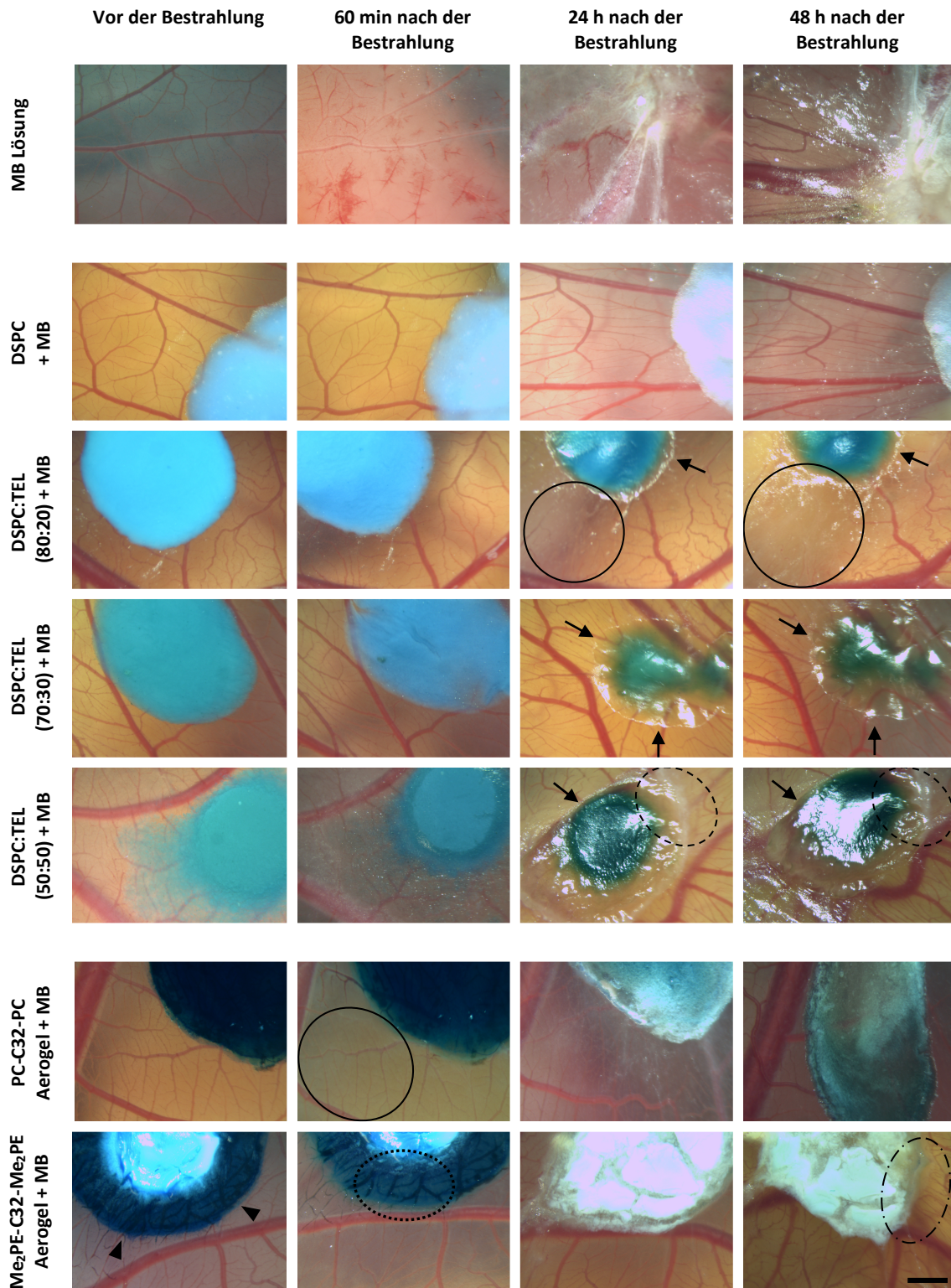
Auch die mittels synthetischen Bolaamphiphilen hergestellten Wirkstoffträgersysteme wurden hinsichtlich ihrer Verträglichkeit unter der PDT getestet (ii) (siehe Abbildung 40), jedoch fand aufgrund der Ergebnisse aus den vorangegangenen Versuchen ein Verzicht auf die Therapie mit PC-C32-PC- bzw. Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE-haltigen Hydrogelen statt. Bereits bei dem Versuch auf Langzeitverträglichkeit der Aerogele auf der CAM Oberfläche zeigte sich hier wiederum ein deutlicher Unterschied im Hydrierungsverhalten beider Bolaamphiphile. Sehr kurz nach der Applikation des PC-C32-PC Aerogels fand eine vollständige Hydratisierung statt, was sich deutlich an dem unter dem Trägersystem sichtbaren Blutgefäßsystem der CAM zeigt. Im Gegensatz dazu blieb das Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE-haltige Aerogel über den gesamten Versuchszeitraum von 48 Stunden unvollständig dehydriert und behielt seinen Aerogelcharakter bei. Ebenso wie die Wirkstoffträgersysteme mit enthaltenen TEL trocknete das Aerogel aus PC-C32-PC nach der kompletten Hydratisierung am Rand des Systems etwas an (siehe Pfeile). Die vorübergehende Trübung 24 Stunden nach der Bestrahlung verschwand nach 48 Stunden wieder und hatte ebenso wie das leichte Antrocknen keinen Einfluss auf die gute Schleimhautverträglichkeit des



Wirkstoffträgersystems. Die Integrität der Blutgefäße blieb trotz des vorhandenen Aerogels aus Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE und Bestrahlung unangetastet, so dass auch hier eine vollständige Verträglichkeit der Therapie anzunehmen ist.

Abbildung 41 zeigt die stereomikroskopischen Bilder der CAM zu verschiedenen Zeitpunkten der LED-vermittelten PDT mit MB. Die Verträglichkeit der Therapie unter der Anwendung von i) DSPC und DSPC:TEL VPGs und ii) aus PC-C32-PC bzw. Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE hergestellten Aerogelen wurde mit wässriger MB-Lösung (Konzentration 0,768µg/µl) verglichen.

Die mit wässriger MB-Lösung durchgeführte PDT hatte erheblichen Einfluss auf die Blutgefäße der CAM. Unmittelbar nach der Bestrahlung mit LED waren bereits kleinere Koagulationen von festen Blutbestandteilen, größere Thromben sowie Lyse der Gefäße erkennbar, die in der Folge zu starker Einblutung in das umliegende Gewebe führten. In Abbildung 41 ist dies 60 Minuten nach der Bestrahlung anhand der fehlenden Blutgefäße, sowie dem ausgetretenen Blut deutlich sichtbar. Betrachtet man die Referenz 24 bzw. 48 Stunden nach der Bestrahlung so wird deutlich, dass die aPDT erheblichen Schaden an der Membran verursachte, der klar anhand der strukturellen Veränderung der Membran ersichtlich ist. Die weißlich erscheinende Membran ist nicht mehr adäquat durchblutet und erscheint nekrotisch. Die durch die aPDT ausgelöste Entzündungsreaktion führt augenscheinlich zu einem Reparaturmechanismus des geschädigten Organismus, der durch die vermehrte Blutgefäßbildung und durch den beginnenden Abbau des betroffenen Abschnittes erkennbar ist (siehe Abbildung 41 – MB-Lösung 48 h) [171].



**Abbildung 41:** Stereomikroskopische Aufnahmen der CAM Oberfläche bei 13-facher Vergrößerung an verschiedenen Zeitpunkten der angewandten, LED-vermittelten PDT unter Anwendung von mit Methylenblau (MB) beladenen DSPC- und DSPC:TEL-haltigen VPGs und aus synthetischen Bolaamphiphilen hergestellten Aerogelen verglichen mit einer wässrigen MB-Lösung gleicher Konzentration. Die Pfeile zeigen die beginnende Trocknung der Wirkstoffträgersysteme, die Kreise bezeichnen morphologische Veränderungen der CAM als Reaktion auf die angewandte PDT. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm.

Verglichen mit der MB-Lösung ist der Schaden 24 bzw. 48 Stunden nach der Bestrahlung bei allen Wirkstoffträgersystemen deutlich geringer. Im Gegensatz zu der unmittelbar nach der Bestrahlung eintretenden Reaktion der Blutgefäße, zeigte das umliegende Gefäßsystem der CAM mit (i) DSPC und DSPC:TEL haltigen Wirkstoffträgersystemen keine unmittelbare Reaktion und der Kapillarplexus blieb nahezu unversehrt. Das mit MB beladene Wirkstoffträgersystem aus DSPC:TEL (50:50), welches eine geringere Viskosität aufwies als die anderen Systeme, bewegte sich während der Inkubationszeit von drei Stunden auf der CAM Oberfläche, was an der zurückbleibenden dünnen Schicht aus Hydrogel und MB vor der Bestrahlung sichtbar war. Dennoch zeigten die Gefäße 60 Minuten nach der Bestrahlung dort keine Blutungsneigung, was auf eine gute Verträglichkeit innerhalb der ersten Stunde nach der Behandlung schließen lässt. Die Therapie unter Einbezug des mit MB beladenen DSPC-haltigen VPG hatte keinen Einfluss auf die Integrität der Blutgefäße, wohingegen das DSPC:TEL (80:20) Trägersystem nach 24 Stunden in unmittelbarer Umgebung eine Reduktion der Gefäße zeigte (durchgezogener Kreis). Dies verstärkte sich 48 Stunden nach der Bestrahlung nochmals, jedoch ohne die bei der MB-Lösung vermittelten Reparaturmechanismen der CAM auszulösen. Der Therapie unter DSPC:TEL (50:50) folgte nach 24 Stunden ebenfalls eine Veränderung in der Blutgefäßstruktur, die nochmals verstärkt bei 48 Stunden nach erfolgter Bestrahlung zu beobachten war (klein-gestrichelter Kreis). Am Rand des Hydrogels erscheint auch hier die CAM weißlich und nekrotisch, doch nicht so stark ausgeprägt wie bei der MB-Referenzlösung. Abschließend lässt sich festhalten, dass alle Hydrogele aufgrund der geringeren Schädigung der Gefäße im beschriebenen Versuch eine bessere Schleimhautverträglichkeit aufweisen, als die wässrige MB-Lösung. Dabei sind sowohl das DSPC- als auch das DSPC:TEL (70:30)-haltige VPG am verträglichsten.

Analog zu der PDT mit dem unbeladenen Wirkstoffträgersystemen fand auch bei der PDT mit Wirkstoff bei allen mit verschiedenen Anteilen TEL hergestellten Systemen ein leichtes Antrocknen der Ränder statt (durch Pfeile gekennzeichnet). Das Fehlen jeglicher Schädigungen am Kapillarplexus der CAM beim mit MB beladenen DSPC-haltigen VPG und dem mit MB versehenen Wirkstoffträgersystem aus DSPC:TEL (70:30) lassen jedoch den Schluss zu, dass dies der Verträglichkeit der Therapie nicht schadete.



Unter der LED-vermittelten PDT zeigten die aus PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE entstandenen Aerogele (ii) eine gute Verträglichkeit (siehe Abbildung 41). Im Gegensatz zum PC-C32-PC Aerogel wurde innerhalb der dreistündigen Inkubationszeit MB aus dem Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE-haltigen Trägersystem in das umliegende Gewebe freigesetzt (durch schwarze Dreiecke gekennzeichnet). Dies führte im Anschluss an die Bestrahlung zum Gefäßverschluss großer Gefäße durch Thrombenbildung unterhalb des freigesetzten Wirkstoffes (gestrichelter Kreis). Im weiteren Verlauf der Therapie wurde der Wirkstoff aus dem Trägersystem nahezu vollständig abgebaut; bereits 24 Stunden nach der Bestrahlung erschien das Aerogel komplett weiß gefärbt. 48 Stunden nach der Therapie waren am Rand des Wirkstoffträgersystems Gefäßneubildungen zu erkennen (Angiogenese), die auf eine Reaktion auf die durch Thromben geschädigten Gefäße unter der Therapie deuten (strichgepunkteter Kreis). Aufgrund der Undurchsichtigkeit des Aerogels war es nicht möglich die Integrität der Blutgefäße direkt unterhalb des Wirkstoffträgersystems zu beurteilen.

Auch beim PC-C32-PC Aerogel war eine Reaktion auf die Bestrahlung innerhalb der ersten 60 Minuten erkennbar. Die CAM um das Wirkstoffträgersystem reagierte mit einer Reduktion des Blutstroms, was sich in verkleinert erscheinenden Gefäßen zeigte (durchgezogener Kreis). Im Gegensatz zum Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE-haltigen Aerogel behielt das PC-C32-PC Pendant seine bläuliche Farbe, was auf verbliebenen Wirkstoff hindeutet. Die Blutgefäße in unmittelbarer Nähe des Trägersystems zeigten Anzeichen von lokaler Entzündung, die sich in weißlichen Schlieren bemerkbar machte, jedoch nicht von langer Dauer war. Bereits 48 Stunden nach der Behandlung mit LED war die Integrität der Blutgefäße wieder vollkommen hergestellt. Während das Trägersystem aus Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE in Form und Konsistenz unverändert blieb, zeigte das rasch nach der Applikation komplett hydrierte PC-C32-PC Bolaamphiphil mit wachsender Versuchsdauer eine Abnahme der Festigkeit, bis es 48 Stunden nach Beginn der Therapie wässrige Konsistenz erreichte.

## 9. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden neuartige Wirkstoffträgersysteme auf der Basis von natürlich vorkommenden und synthetischen Bolaamphiphilen für die antimikrobielle photodynamische Therapie (aPDT) gegenüber Bakterien und Hefen generiert, charakterisiert und erste *in vitro* Versuche durchgeführt. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von stabilen Trägersystemen aus beiden Bolaamphiphilen, welche sowohl eine adäquate Therapie ermöglichen, als auch haut- und schleimhautverträglich sind. Dabei wurden beide Systeme gegenübergestellt.

In **Kapitel 1** erfolgte eine Einleitung an dem dieser Arbeit zugrundeliegenden Thema mit einer Erläuterung der Problematik von wachsender Antibiotikaresistenz bei chronischen Wunden und durch Hefen verursachten Schleimhautinfektionen, mit gleichzeitig fehlendem adäquatem Therapie- und Wundmanagement. Die Photodynamische Therapie (PDT) als möglicher Lösungsansatz wurde vorgestellt und der Vorteil der Anwendung von Wirkstoffträgersystemen aus Bolaamphiphilen hervorgehoben. Dem ersten Kapitel nachfolgend fand die Zusammenfassung und Erläuterung der in dieser Arbeit verwendeten Herstellungs- und Charakterisierungsmethoden in **Kapitel 2** statt.

In **Kapitel 3** sind die Herstellung und Charakterisierung beider Wirkstoffträgersysteme dargestellt. Zunächst konnten die natürlichen bolaamphiphilen Lipide (Tetraetherlipide – TEL) erfolgreich aus der Biomasse von *Sulfolobus acidocaldarius* extrahiert und unter Zuhilfenahme des Phospholipids 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin (DSPC) in verschiedenen Massenanteilen stabile vesikuläre Phospholipid Gele (VPGs) entwickelt werden. Die Charakterisierung selbiger fand mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM), cryo-Transmissionselektronenmikroskopie (cryo-TEM) und Rotationsviskosimetrie statt. In den REM Aufnahmen war festzustellen, dass sich die Trägersysteme teilweise mit und ohne eingearbeiteten Wirkstoff voneinander unterschieden. Die aufgestellte Hypothese, dass bei dem mit DSPC:TEL (50:50) hergestellten VPG ohne Methylenblau (MB) eine Phasenseparation des Systems vorlag, wurde bei den daran anknüpfenden cryo-TEM Untersuchungen bestätigt. Die bei der Messung auf 2 mg/mL verdünnten VPGs zeigten wie erwartet die sich spontan im wässrigen Medium bildenden Strukturen von Phospholipiden und TEL. Zu beobachten war eine Zunahme der Vesikelgröße mit wachsenden Anteilen zugesetzten TEL. Im Gegensatz dazu zeigte das DSPC:TEL (50:50)-System keine einheitlichen Vesikel, sondern gleichzeitig auftretende mizellare und vesikuläre

Strukturen. Die Charakterisierung des Fließverhaltens mittels Rotationsviskosimeter offenbarte Unterschiede zwischen den aus DSPC und DSPC:TEL (50:50) hergestellten Trägersystemen mit und ohne MB, welche sich bereits in den REM Aufnahmen andeuteten, im Gegensatz zu den VPGs aus DSPC:TEL (80:20) und DSPC:TEL (70:30). Bei der rheologischen Untersuchung der aus PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE gewonnenen Hydrogele konnte festgestellt werden, dass die Stabilität der selbstorganisierten Hydrogele bei minimalen Scherkräften abnahm, so dass ein Verbleib der Trägersysteme am späteren Applikationsort mit ausreichend hoher Belastbarkeit nicht sicher angenommen werden konnte. Im Anschluss an eine stattfindende Sublimation der inneren Phase in einem herkömmlichen Gefriertrockner wurden stabile Aerogele erzeugt, die sich durch Zugabe von Flüssigkeit *in situ* zu Hydrogelen rückwandelten. Die vollständig hydrierten Aerogele zeigten im Rheogramm ein nur geringfügig anderes Verhalten als vor der Aerogel-Bildung. Eine morphologische Charakterisierung der Aerogele fand wie bei den VPGs ebenfalls mittels REM statt. Sowohl das aus PC-C32-PC hergestellte Aerogel als auch das Pendant mit Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE zeigten dabei eine gleichmäßige Porung innerhalb des Trägersystems, welche mit denen von gefriergetrockneten Hydrogelen vergleichbar ist, die bereits als intelligente Wundauflagen in der Therapie von tiefen Wunden eingesetzt werden.

In **Kapitel 4** sind die pharmakologischen Aspekte der Wirkstoffträgersysteme dargestellt. Alle getesteten Gele konnten den eingeschlossenen Wirkstoff aus dem System entlassen: Die VPGs aus DSPC und DSPC:TEL waren in der Lage MB retardiert über mehrere Tage freizusetzen. Insbesondere die aus DSPC:TEL (80:20) und DSPC:TEL (70:30) hergestellten Systeme mit einer Freisetzungsdauer von 7 Tagen sind sehr interessante Kandidaten für eine Langzeittherapie von chronischen Wundinfektionen. Anders die Aerogele aus PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE deren Freisetzung aufgrund der hohen Austrittsgeschwindigkeit des Wirkstoffes zu Beginn und der erst später eintretenden, retardiert wirkenden Gelbildung lediglich sechs bzw. acht Stunden benötigten. Dieser Umstand erschwerte den Einsatz der nativen Aerogele als intelligente Wirkstoffträgersysteme für eine Langzeittherapie. Im Gegensatz dazu zeigen die hydrierten Aerogele (Hydrogele) eine deutlich kontrollierte Freisetzung, die hinsichtlich der Freisetzungsdauer den als Referenz herangezogenen Hydroxyethylcellulose 300 (HEC 300) Hydrogelen überlegen war. Die Vorteile beider Systeme zu kombinieren, scheint effektiver zu sein. Aerogele besitzen eine

Langzeitstabilität und sind ein einfach zu handhabendes System zur *in situ* Hydrogelbildung.

Die Untersuchung der photodynamischen Wirkung der Wirkstoffträgersysteme auf den grampositiven Keimen *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* (DSM 18669) und *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 25923) sowie auf das gramnegative Bakterium *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) fanden in **Kapitel 5** statt. Auf die grampositiven Bakterien zeigte sich auch ohne einwirkende Bestrahlung ein bakteriostatischer Effekt unter der MB-vermittelten Behandlung mit den Trägersystemen, was auf den bakteriostatischen Effekt des MB selbst zurückzuführen war. Bei Bestrahlung konnte eine gesteigerte bakteriostatische Wirkung bei beiden Keimen festgestellt werden. Die bakterizide Wirkung trat unter der aPDT bei beiden Keimen auf, konnte jedoch lediglich bei *S. saprophyticus* subsp. *bovis* (DSM 18669) quantitativ bestimmt werden, da die Messdaten aus dem Šumperk Krankenhaus der Tschechischen Republik, wo die Versuche stattfanden, nicht vorlagen. *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) zeigte keine Sensitivität gegenüber den mit MB beladenen Wirkstoffträgersystemen ohne angewandte aPDT. Erst mit der Bestrahlung fanden sowohl eine bakteriostatische als auch eine bakterizide Wirkung statt, die jedoch in ihrer Ausprägung geringer ausfiel als bei den grampositiven Bakterien.

**Kapitel 6** befasste sich mit der Charakterisierung der aPDT Sensitivität von Hefen unter einer Therapie mit den hergestellten Trägersystemen aus natürlichen und synthetischen Bolaamphiphilen. Als Modellkeim diente dabei *Saccharomyces cerevisiae*. Analog zu den grampositiven Kokken, war bei den Mikroorganismen auch ohne Bestrahlung eine geringe fungistatische und vereinzelt fungizide Wirkung vorhanden. Unter der aPDT verstärkten sich beide Effekte deutlich bei allen Wirkstoffträgersystemen, die bis auf das PC-C32-PC Aerogel der Kontrollgruppe überlegen waren.

Sowohl Schleimhäute als auch das Wundbett sind Applikationsorte, die besondere Ansprüche an das Trägersystem stellen. Daher fand in **Kapitel 7** die Untersuchung der Verträglichkeit von aus DSPC und DSPC:TEL hergestellten Gele gegenüber Blutbestandteilen statt. Die VPGs wurden sowohl mit als auch ohne Wirkstoff auf ihr hämolytisches Potential getestet. Sowohl die Trägersysteme aus DSPC als auch die mittels DSPC:TEL (80:20) hergestellten, zeigten mit und ohne MB gute Verträglichkeit gegenüber Erythrozyten. Die mittels DSPC:TEL (70:30) und DSPC:TEL (50:50) hergestellten Systeme wiesen einen mäßig hohen hämolytischen Wert auf, der in den

Verunreinigungen des verwendeten GLE begründet liegt. Zusammenfassend ließ sich daher feststellen, dass lediglich die DSPC- und DSPC:TEL (80:20)-haltigen Wirkstoffträgersysteme für die MB-vermittelte aPDT vollumfänglich geeignet sind. Dieser Versuch konnte aufgrund des geringen Probenvolumens nicht mit den Aerogelen aus PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE durchgeführt werden.

Die Langzeitverträglichkeit der Aerogele, die Kompatibilität mit Schleimhäuten sowie die Toleranz von selbigen gegenüber der angewandten aPDT aller bolaamphiphil-haltigen Wirkstoffträgersysteme wurde abschließend in **Kapitel 8** unter Zuhilfenahme der Chorioallantois-Membran (CAM) evaluiert. Zunächst konnte mittels des „henn’s egg test on the chorioallantoic membrane“ (HET-CAM) die Schleimhautverträglichkeit der aus DSPC, DSPC:TEL, PC-C32-PC und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE hergestellten Gele vergleichend mit einem für die vaginale Applikation geeigneten Hydrogel aus HEC 300 verglichen werden. Dabei war die Verträglichkeit der neuartigen Wirkstoffträgersysteme aus Bolaamphiphilen mit jenem aus HEC 300 vergleichbar. Um die Langzeitverträglichkeit der aus synthetischen Bolaamphiphilen generierten Aerogele am späteren Applikationsort zu untersuchen, fand beginnend mit Tag 9 der embryonalen Entwicklung eine tägliche Beobachtung des Wachstumsverhaltens der Blutgefäße und das Auftreten von Blutungen, Gefäßlyse oder Koagulation in unmittelbarer Umgebung des Aerogels bis einschließlich Tag 14 sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch statt. Dabei trat ein unterschiedliches Hydratationsverhalten beider Aerogele in Erscheinung, welches sich jedoch nicht auf die Verträglichkeit auswirkte. Beide Systeme waren gegenüber dem wachsenden Blutgefäßsystem inert und es waren keine Abwehrreaktionen sichtbar. Nebenwirkungen der aPDT können neben der Eradikation der auf der Haut, Schleimhaut oder im Wundbett befindlichen Mikroorganismen auch Schädigungen an gesundem Gewebe sein. Daher fand eine Untersuchung der Biokompatibilität der Therapie auf der CAM ebenfalls in **Kapitel 8** statt. Um sicherzustellen, dass weder die einwirkende Strahlung noch die Trägersysteme ohne Wirkstoff Einfluss auf die Integrität der Blutgefäße nahmen, wurden diese Parameter vorab ausgeschlossen. Die LED-vermittelte aPDT mit MB unter Anwendung der DSPC- und DSPC:TEL-haltigen VPGs sowie der PC-C32-PC- und Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE-haltigen Aerogele fand vergleichend mit wässriger MB-Lösung gleicher Konzentration statt. Verglichen mit der MB-Lösung war der Schaden nach der Bestrahlung bei allen Wirkstoffträgersystemen deutlich geringer. Insbesondere 24 bzw. 48 Stunden nach der Behandlung fanden sich gravierende Unterschiede bezüglich der Gefäßintegrität

innerhalb der CAM. Während bei der Referenz die erheblichen Schäden während der Behandlung für eine strukturelle Veränderung der CAM sorgte, die sich in weißlich-nekrotischem Erscheinungsbild äußerte, blieben dieses bei der aPDT mit allen neuartig entwickelten Wirkstoffträgersystemen aus Bolaamphiphilen aus. Dieser Umstand belegt die im Vergleich zur Referenzlösung gleicher Wirkstoffkonzentration überlegene Verträglichkeit der Gele.

Zusammenfassend ist es daher festzustellen, dass es gelungen ist stabile Formulierungen aus sowohl natürlichen als auch synthetischen Bolaamphiphilen zu entwickeln, die für die antimikrobielle photodynamische Therapie geeignet sind und gleichzeitig eine gute Verträglichkeit aufweisen. Dieser Umstand qualifiziert sie als potentiell gute Kandidaten für die klinische Anwendung für Haut-, Schleimhaut und Wundinfektionen.

## 10. Summary

Within the scope of the present doctoral thesis, novel drug carrier systems based on naturally occurring and synthetic bolaamphiphiles for antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) against bacteria and fungi were generated, characterized and first *in vitro* tests were carried out. The aim of this work was the development of stable carrier systems, which allow adequate therapy while being skin and mucous membrane compatible.

**Chapter 1** introduced the topic with an explanation of the problem of increasing antibiotic resistance in chronic wounds and mucosal infections caused by yeast, while simultaneously an adequate therapy and wound management is not available. Photodynamic therapy (PDT) was presented as a possible solution, highlighting the advantage of drug delivery systems made from bolaamphiphiles. The first chapter was followed by a summary and explanation of the manufacturing and characterization methods used in this work (**chapter 2**).

**Chapter 3** addressed the production and characterization of both drug delivery systems. First, the natural bolaamphiphilic lipids (tetraether lipids - TEL) were successfully extracted from the freeze-dried biomass of *Sulfolobus acidocaldarius*. By adding the phospholipid DSPC in various proportions, stable vesicular phospholipid gels (VPGs) were developed. These were characterized by means of scanning electron microscopy (SEM), cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM) and rotational viscosimetry. SEM images showed differences between the native carrier system and those with incorporated methylene blue (MB). VPG produced with DSPC:TEL (50:50) without drug showed a phase separation of the system, which could be confirmed by cryo-TEM examinations. Cryo-TEM pictures were carried out with the VPGs diluted to 2 mg/mL and, as expected, showed the structures phospholipids and TEL form spontaneously in aqueous media. An increase in the vesicle size with increasing proportions of added TEL was observed. In contrast to the other systems, DSPC:TEL (50:50)-VPG did not show uniform vesicles, but rather micellar and vesicular structures occurring simultaneously. Viscosity characterization using rotational viscometer revealed differences between the carrier systems with and without MB for DSPC and DSPC:TEL (50:50) formulations, which could already been suspected from the SEM images. In contrast to that DSPC:TEL (80:20) and DSPC:TEL (70:30) VPGs showed nearly the same rheological behavior. During the rheological investigation of the hydrogels obtained from PC-C32-PC and

Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE the stability of the self-organized hydrogels decreased with minimal shear forces. This fact indicates an inadequate stability at the application site using these hydrogels. With the help of sublimation in a conventional freeze-drier it was possible to create stable aerogels which could be transformed into hydrogels *in situ* by addition of water. The fully hydrated aerogels showed only slightly different behavior in the rheogram compared to original hydrogels. Morphological characterization of the aerogels was realized using SEM. Both aerogels showed uniform pores within the carrier system. This is comparable to freeze-dried hydrogels, which are already used as intelligent wound dressings in the therapy of deep wounds.

**Chapter 4** investigated the drug release behavior of the drug delivery systems. All of the gels tested were able to release MB: The vesicular phospholipid gels were able to release MB in a sustained manner over several days. In particular, the VPGs made from DSPC:TEL (80:20) and DSPC:TEL (70:30) with a release time of seven days are very interesting candidates for long-term therapy of chronic wound infections. In contrast the release of PC-C32-PC and Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE aerogels took only six and eight hours, respectively, due to the burst-release of the active ingredient at the beginning and the delayed gel formation. This fact hampers the use of native aerogels as intelligent drug delivery systems for long-term therapy. In contrast, the hydrated aerogels (hydrogels) show a clearly delayed release, which was superior to HEC 300 hydrogels used as reference. Combining the advantages of both systems appears to be more effective. Aerogels have long-term stability and are an easy-to-use system for *in situ* hydrogel formation.

The investigation of the photodynamic effect of the drug carrier systems on the gram-positive germs *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* (DSM 18669) and *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 25923) and the gram-negative bacteria *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) was discussed in **Chapter 5**. To the gram-positive germ a bacteriostatic effect under the MB-mediated treatment with the carrier systems even without exposure to radiation could be observed due to the bacteriostatic effect of the MB itself. After irradiation an increased bacteriostatic effect was found for both germs. The bactericidal effect occurred under the aPDT in both germs but could only be quantified in *S. saprophyticus* subsp. *bovis* (DSM 18669), as the measurement data from the Šumperk Hospital in the Czech Republic, where the experiments were carried out, was not available. *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) showed no sensitivity to the active substance carrier systems loaded with MB without applied aPDT. After irradiation both bacteriostatic



and bactericidal effect took place. However, the effect was less distinctive compared to gram-positive bacteria.

**Chapter 6** dealt with the characterization of the aPDT sensitivity of yeasts under therapy with the carrier systems made from natural and synthetic bolaamphiphiles. *Saccharomyces cerevisiae* was chosen as model germ. Similar to the gram-positive cocci, the microorganisms exhibited a slight fungistatic and occasional fungicidal effect even without irradiation. Using aPDT, both effects were considerably increased in all drug delivery systems. Additionally, with exception of the PC-C32-PC aerogel, all systems were superior compared to the control group.

Mucous membranes and the wound bed represent application sites which have special requirements on the drug delivery systems. For this reason, **Chapter 7** examined the compatibility of gels made from DSPC and DSPC:TEL with blood components. All VPGs with and without MB were tested for their hemolytic potential. Drug delivery systems containing DSPC and DSPC:TEL (80:20) showed no hemolytic value. Based on the use of higher amount of GLE with included impurities VPGs made by DSPC:TEL (70:30) and DSPC:TEL 850:50) demonstrated moderate hemolytic potential. In summary, it was found that only the DSPC- and DSPC:TEL (80:20)-system fulfill all requirements of good tolerability with blood components. Due to the small sample volume, this experiment could not be carried out with the aerogels made by PC-C32-PC and Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE.

Long-term biocompatibility of the aerogels, the mucosal tolerance and the tolerance of the applied aPDT of all drug delivery systems made from bolaamphiphils were finally evaluated in **Chapter 8** using the chorioallantoic membrane (CAM). The mucosal compatibility of the gels of DSPC, DSPC: TEL, PC-C32-PC and Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE was compared with a hydroxyethyl cellulose 300 (HEC 300) hydrogel, suitable for vaginal application, using the “henn’s egg test on the chorioallantoic membrane” (HET-CAM). Biocompatibility of the bolaamphiphilic drug delivery systems matched that of the HEC 300 hydrogel. In order to investigate the long-term biocompatibility of the PC-C32-PC and Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE aerogels daily observations starting on egg development day 9 (EDD 9) of the blood vessels on CAM surface were conducted till EDD 14. A different hydration behavior of both aerogels was noticed which, however, did not affect the tolerability. Both systems were inert to the growing blood vessel system and no defense reactions were visible.

Side effects of PDT can include eradication of the microorganisms on the skin, mucous membrane or in the wound bed, as well as damage to healthy tissue. An examination of the biocompatibility of the therapy on the CAM was therefore carried out in Chapter 8 also. In order to ensure that neither the acting radiation nor the drug delivery system without active ingredient influenced the integrity of the blood vessels, these parameters were excluded in advance. The LED-mediated aPDT with MB using the DSPC and DSPC: TEL VPGs as well as the PC-C32-PC and Me<sub>2</sub>PE-C32-Me<sub>2</sub>PE aerogels took place in comparison to aqueous MB solution of the same concentration. Compared to the MB solution, the damage after irradiation is significantly less for all drug delivery systems. In particular, 24 and 48 hours after the treatment, there are serious differences in terms of vascular integrity within the CAM. While the considerable damage during the treatment with the reference system caused a structural change in the CAM, which manifested itself in a whitish-necrotic appearance, no such changes could be observed for the aPDT with all the bolaamphiphile-drug delivery systems. This fact proves the superior compatibility of the gels compared to the reference solution of the same active substance concentration.

In conclusion it can therefore be noted that stable formulations have been successfully developed from both natural and synthetic bolaamphiphiles. They are suitable for antimicrobial photodynamic therapy and at the same time are well tolerated. These characteristics qualify them as potential delivery systems for clinical application on skin, mucous membrane and wound infections.

## 11. Referenzen

1. Hanses, F. Bakterielle Haut-und Weichteilinfektionen. *Zeitschrift für Rheumatologie* **2017**; 76(9) 745-751.
2. Grice, E. A., Segre, J. A. The skin microbiome. *Nature reviews microbiology* **2011**; 9(4), 244-253.
3. Chiller, K., Selkin, B. A., Murakawa, G. J. Skin microflora and bacterial infections of the skin. In *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* **2001**, December; (Vol. 6, No. 3, pp. 170-174). Elsevier.
4. Pflughoeft, K. J., Versalovic, J. Human microbiome in health and disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **2012**; 7, 99-122.
5. Byrd, A. L., Belkaid, Y., Segre, J. A. The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology* **2018**; 16(3), 143.
6. Bowler, P. G. Wound pathophysiology, infection and therapeutic options. *Annals of medicine* **2002**; 34(6), 419-427.
7. Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N., Eccleston, G. M. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *Journal of pharmaceutical sciences* **2008**; 97(8), 2892-2923.
8. Streit, M., Mayer, D., Traber, J. Definitionen von Wunden: akute und chronische Wunden. *Zeitschrift für Wundheilung* **2008**; (3), 159-166.
9. A\_Bowler, P. G., Duerden, B. I., Armstrong, D. G. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clinical microbiology reviews* **2001**; 14(2), 244-269.
10. McCaig, L. F., McDonald, L. C., Mandal, S., Jernigan, D. B. Staphylococcus aureus-associated skin and soft tissue infections in ambulatory care. *Emerging infectious diseases* **2006**; 12(11), 1715.
11. Maisch, T., Szeimies, R. M., Jori, G., Abels, C. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2004**; 3(10), 907-917.
12. Dissemond, J. Physikalische Therapien des chronischen Ulcus cruris. *Der Hautarzt* **2010**; 61(5), 387-396.
13. Edwards, R., Harding, K. G. Bacteria and wound healing. *Current opinion in infectious diseases* **2004**; 17(2), 91-96.

14. Vassel-Biergans, A., Probst, W. Wundversorgung für die Pflege. *Ein Praxisbuch* **2011**; 2.
15. Dai, T., Huang, Y. Y., Hamblin, M. R. Photodynamic therapy for localized infections—state of the art. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2009**; 6(3-4), 170-188.
16. Field, C. K., Kerstein, M. D. Overview of wound healing in a moist environment. *The American journal of surgery* **1994**; 167(1), S2-S6.
17. Lin, C. C., Metters, A. T. Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Advanced drug delivery reviews* **2006**; 58(12-13), 1379-1408.
18. Caló, E., Khutoryanskiy, V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal* **2015**; 65, 252-267.
19. Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z., Akil, H. M. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C* **2015**; 57, 414-433.
20. Gustaite, S., Kazlauskė, J., Bobokalonov, J., Perni, S., Dutschk, V., Liesiene, J., Prokopovich, P. Characterization of cellulose based sponges for wound dressings. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects* **2015**; 480, 336-342.
21. Nesi-Reis, V., Lera-Nonose, D. S. S. L., Oyama, J., Silva-Lalucci, M. P. P., Demarchi, I. G., Aristides, S. M. A., Teixeira, J. J. V., Silveira, T.G.V., Lonardoni, M. V. C. Contribution of photodynamic therapy in wound healing: A systematic review. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2018**; 21, 294-305.
22. Hajdu, S., Obradovic, A., Presterl, E., Vecsei, V. Invasive mycoses following trauma. *Injury* **2009**; 40(5), 548-554.
23. Baltazar, L. M., Ray, A., Santos, D. A., Cisalpino, P. S., Friedman, A. J., Nosanchuk, J. D. Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. *Frontiers in microbiology* **2015**; 6, 202.
24. Patterson, T. F. Advances and challenges in management of invasive mycoses. *The Lancet* **2005**; 366(9490), 1013-1025.
25. von Lilienfeld-Toa, M., Wagener, J., Eisnele, H. Invasive Pilzinfektionen. *Dtsch Arztebl Int* **2019**; 116(16), 271-278.

26. Tegos, G., Dai, T., Fuchs, B. B., Coleman, J. J., Prates, R. A., Astrakas, C., St. Denis, T. G., Ribeiro, M. S., Mylonakis, E., Hamblin, M. R. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Frontiers in microbiology* **2012**; 3, 120.
27. Calzavara-Pinton, P. G., Venturini, M., Sala, R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology* **2005**; 78(1), 1-6.
28. Gonzales, F. P., Maisch, T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. *Fungal biology* **2012**; 116(1), 1-10.
29. Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J., Trevijano-Contador, N. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Frontiers in Microbiology* **2020**; 10, 2993.
30. Scwingel, A. R., Barcessat, A. R. P., Núñez, S. C., Ribeiro, M. S. Antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of oral candidiasis in HIV-infected patients. *Photomedicine and Laser Surgery* **2012**; 30(8), 429-432.
31. Freire, F., Ferraresi, C., Jorge, A. O. C., Hamblin, M. R. Photodynamic therapy of oral *Candida* infection in a mouse model. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2016**; 159, 161-168.
32. Lyon, J. P., Moreira, L. M., de Moraes, P. C. G., dos Santos, F. V., de Resende, M. A. Photodynamic therapy for pathogenic fungi. *Mycoses* **2011**; 54(5), e265-e271.
33. Spikes, J. D. Photodynamic action: from paramecium to photochemotherapy. *Photochemistry and Photobiology* **1997**; 65, 142S-147S.
34. Szeimies, R. M. Geschichte der photodynamischen Therapie. *Aktuelle Dermatologie* **2005**; 31(05), 193-197.
35. Castano, A. P., Demidova, T. N., Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2004**; 1(4), 279-293.
36. Brancalion, L., Moseley, H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers in medical science* **2002**; 17(3), 173-186.
37. Duse, L., Pinnapireddy, S. R., Strehlow, B., Jedelská, J., Bakowsky, U. Low level LED photodynamic therapy using curcumin loaded tetraether liposomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2018**; 126, 233-241.

38. Duse, L., Agel, M. R., Pinnapireddy, S. R., Schäfer, J., Selo, M. A., Ehrhardt, C., Bakowsky, U. Photodynamic therapy of ovarian carcinoma cells with curcumin-loaded biodegradable polymeric nanoparticles. *Pharmaceutics* **2019**; 11(6), 282.
39. Ormond, A. B., & Freeman, H. S. Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials* **2013**; 6(3), 817-840.
40. Wainwright, M., Maisch, T., Nonell, S., Plaetzer, K., Almeida, A., Tegos, G. P., Hamblin, M. R. Photoantimicrobials—are we afraid of the light?. *The Lancet Infectious Diseases* **2017**; 17(2), e49-e55.
41. Hamblin, M. R., Hasan, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2004**; 3(5), 436-450.
42. Maisch, T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2015**; 14(8), 1518-1526.
43. Girolardo, L. M., Felipe, M. P., de Oliveira, M. A., Munin, E., Alves, L. P., Costa, M. S. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. *Lasers in medical science* **2009**; 24(1), 109-112.
44. Calzavara-Pinton, P., Rossi, M. T., Sala, R., & Venturini, M. Photodynamic antifungal chemotherapy. *Photochemistry and photobiology* **2012**; 88(3), 512-522.
45. Paardekooper, M., Van den Broek, P. J., De Bruijne, A. W., Elferink, J. G., Dubbelman, T. M., Van Steveninck, J. Photodynamic treatment of yeast cells with the dye toluidine blue: all-or-none loss of plasma membrane barrier properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1992**; 1108(1), 86-90.
46. Tardivo, J. P., Del Giglio, A., De Oliveira, C. S., Gabrielli, D. S., Junqueira, H. C., Tada, D. B., Severino, D., De Fátima Turchiello, R., Baptista, M. S. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2005**; 2(3), 175-191.
47. Wainwright, M., Crossley, K. B. Methylene blue—a therapeutic dye for all seasons?. *Journal of chemotherapy* **2002**; 14(5), 431-443.
48. Miculescu, A., Wiklund, L. Methylene blue, an old drug with new indications. *J Rom Anest Terap Int* **2010**; 17(1), 35-41.
49. Schirmer, R. H., Adler, H., Pickhardt, M., Mandelkow, E. Lest we forget you—methylene blue.... *Neurobiology of aging* **2011**; 32(12), 2325-e7.

50. Link, E. M. Targeting Melanoma with 211 At/131I-Methylene Blue: Preclinical and Clinical Experience. *Hybridoma* **1999**; 18(1), 77-82.
51. Rieger, S. Die antimikrobielle photodynamische Therapie in der Parodontologie. *J. Quintessenz* **2014**; 65(1), 7-15.
52. Meisel, P., Kocher, T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2005**; 79(2), 159-170.
53. Rajesh, S., Koshi, E., Philip, K., Mohan, A. Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. *Journal of Indian Society of Periodontology* **2011**; 15(4), 323.
54. Soukos, N. S., Chen, P. S. Y., Morris, J. T., Ruggiero, K., Abernethy, A. D., Som, S., Foschi, F., Doucette, S., Luschke Bammann, L., Tontana, C. R., Stashenko, P. P. Doukas, A. G. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *Journal of Endodontics* **2006**; 32(10), 979-984.
55. de Souza, S. C., Junqueira, J. C., Balducci, I., Koga-Ito, C. Y., Munin, E., Jorge, A. O. C. Photosensitization of different Candida species by low power laser light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2006**; 83(1), 34-38.
56. Munin, E., Giroldo, L. M., Alves, L. P., Costa, M. S. Study of germ tube formation by Candida albicans after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2007**, 88(1), 16-20.
57. Ansari, M. A., Fatima, Z., Hameed, S. Antifungal action of methylene blue involves mitochondrial dysfunction and disruption of redox and membrane homeostasis in C. albicans. *The Open Microbiology Journal* **2016**; 10, 12.
58. Junqueira, J. C., da Silva Martins, J., Faria, R. L., Colombo, C. E. D., Jorge, A. O. C. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Lasers in medical science* **2009**; 24(6), 877-884.
59. Aspiroz, C., Sevil, M., Toyas, C., Gilaberte, Y. Photodynamic Therapy With Methylene Blue for Skin Ulcers Infected With Pseudomonas aeruginosa and Fusarium spp. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)* **2017**; 108(6), e45-e48.
60. Wainwright, M., Phoenix, D. A., Gaskell, M., Marshall, B. Photobactericidal activity of methylene blue derivatives against vancomycin-resistant Enterococcus spp. *Journal of antimicrobial chemotherapy* **1999**; 44(6), 823-825.
61. Sabbahi, S., Alouini, Z., Jemli, M., Boudabbous, A. The role of reactive oxygen species in Staphylococcus aureus photoinactivation by methylene blue. *Water Science and Technology* **2008**; 58(5), 1047-1054.

62. Gonzales, F. P., Da Silva, S. H., Roberts, D. W., Braga, G. U. Photodynamic inactivation of conidia of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* with methylene blue and toluidine blue. *Photochemistry and photobiology* **2010**; 86(3), 653-661.
63. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance **2014**; World Health Organization.
64. Jori, G., Fabris, C., Soncin, M., Ferro, S., Coppelotti, O., Dei, D., Fantetti, L., Chiti, G., Roncucci, G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery* **2006**; 38(5), 468-481.
65. Schlegel, H. G., Fuchs, G., Eitinger, T. Allgemeine Mikrobiologie, 8., vollst. überarb. und erw. Aufl. **2007**
66. Usacheva, M. N., Teichert, M. C., Biel, M. A. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery* **2003**; 33(5), 311-319.
67. Wainwright, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **1998**; 42(1), 13-28.
68. Paardekooper, M., Gompel, A. E. V., Steveninck, J. V., Broek, P. J. V. D. The effect of photodynamic treatment of yeast with the sensitizer chloroaluminum phthalocyanine on various cellular parameters. *Photochemistry and photobiology* **1995**; 62(3), 561-567.
69. Meister, A. Aggregationsverhalten klassischer und bipolarer Amphiphile an der Luft-Wasser-Grenzfläche und in wässriger Volumenphase. (Habilitation thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg **2008**)
70. Fuhrhop, J. H., Wang, T. Bolaamphiphiles. *Chemical Reviews* **2004**; 104(6), 2901-2938.
71. <https://de.wikipedia.org/wiki/Bola> (20.09.2020)
72. Gulik, A., Luzzati, V., De Rosa, M., Gambacorta, A. Structure and polymorphism of bipolar isopranyl ether lipids from archaebacteria. *Journal of molecular biology* **1985**; 182(1), 131-149.
73. Woese, C. R. Bacterial evolution. *Microbiological reviews* **1987**; 51(2), 221.



74. Brock, T. D., Brock, K. M., Belly, R. T., Weiss, R. L. Sulfolobus: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Archiv für Mikrobiologie* **1972**; 84(1), 54-68.
75. Ulrih, N. P., Gmajner, D., Raspor, P. Structural and physicochemical properties of polar lipids from thermophilic archaea. *Applied microbiology and biotechnology* **2009**; 84(2), 249-260.
76. Jain, S., Caforio, A., Driessen, A. J. Biosynthesis of archaeal membrane ether lipids. *Frontiers in microbiology* **2015**; 5, 641.
77. Robb, F., Antranikian, G., Grogan, D., Driessen, A. (Eds.). *Thermophiles: biology and technology at high temperatures* **2007**; CRC Press.
78. Gliozzi, A., Relini, A., Chong, P. L. G. Structure and permeability properties of biomimetic membranes of bolaform archaeal tetraether lipids. *Journal of Membrane Science* **2002**; 206(1-2), 131-147.
79. De Rosa, M., Gambacorta, A., Bu'Lock, J. D. Extremely thermophilic acidophilic bacteria convergent with Sulfolobus acidocaldarius. *Microbiology* **1975**; 86(1), 156-164.
80. Langworthy, T. A. Lipids of archaebacteria. *The bacteria* **1985**; 8, 459-497.
81. Lo, S. L., Chang, E. L. Purification and characterization of a liposomal-forming tetraether lipid fraction. *Biochemical and biophysical research communications* **1990**; 167(1), 238-243.
82. Freisleben, H. J., Bormann, J., Litzinger, D. C., Lehr, F., Rudolph, P., Schatton, W., Huang, L. Toxicity and biodistribution of liposomes of the main phospholipid from the archaebacterium Thermoplasma acidophilum in mice. *Journal of Liposome Research* **1995**; 5(1), 215-223.
83. Cavaghetto, F., Relini, A., Mirghani, Z., Gliozzi, A., Bertoia, D., Gambacorta, A. Molecular packing parameters of bipolar lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1992**; 1106(2), 273-281.
84. Bakowsky, U., Rothe, U., Antonopoulos, E., Martini, T., Henkel, L., Freisleben, H. J. Monomolecular organization of the main tetraether lipid from Thermoplasma acidophilum at the water–air interface. *Chemistry and Physics of Lipids* **2000**; 105(1), 31-42.
85. Chong, P. L. G. Archaeobacterial bipolar tetraether lipids: physico-chemical and membrane properties. *Chemistry and Physics of Lipids* **2010**; 163(3), 253-265.

86. Gambacorta, A., Gliozzi, A., De Rosa, M. Archaeal lipids and their biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **1995**; 11(1), 115-131.
87. Gabriel, J. L., Chong, P. L. G. Molecular modeling of archaeobacterial bipolar tetraether lipid membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* **2000**; 105(2), 193-200.
88. Gulik, A., Luzzati, V., DeRosa, M., Gambacorta, A. Tetraether lipid components from a thermoacidophilic archaeobacterium: chemical structure and physical polymorphism. *Journal of molecular biology* **1988**; 201(2), 429-435.
89. IAO, V. Liposomes: from physics to applications. **1993**
90. Bangham, A. D., Horne, R. W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of molecular biology* **1964**; 8(5), 660-IN10.
91. Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., Deng, Y. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian journal of pharmaceutical sciences* **2015**; 10(2), 81-98.
92. Gregoriadis, G., Leathwood, P. D., Ryman, B. E. Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS letters* **1971**, 14(2), 95-99.
93. Plenagl, N., Duse, L., Seitz, B. S., Goergen, N., Pinnapireddy, S. R., Jedelská, J., Brüßler, J., Bakowsky, U. Photodynamic therapy–hypericin tetraether liposome conjugates and their antitumor and antiangiogenic activity. *Drug delivery* **2019**; 26(1), 23-33.
94. Ali, S., Amin, M. U., Ali, M. Y., Tariq, I., Pinnapireddy, S. R., Duse, L., Goergen, N., Wölk, C., Hause, G., Jedelská, J., Bakowsky, U., Schäfer, J. Wavelength dependent photo-cytotoxicity to ovarian carcinoma cells using temoporfin loaded tetraether liposomes as efficient drug delivery system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2020**.
95. De Rosa, M. Archaeal lipids: structural features and supramolecular organization. *Thin Solid Films* **1996**; 284, 13-17.
96. Brandl, M., Drechsler, M., Bachmann, D., Bauer, K. H. Morphology of semisolid aqueous phosphatidylcholine dispersions, a freeze fracture electron microscopy study. *Chemistry and physics of lipids* **1997**; 87(1), 65-72.
97. Gregoriadis, G. (Ed.). *Liposome technology* **1984**; (Vol. 1). Boca Raton, FL: CRC press.

98. Breitsamer, M., Winter, G. Vesicular phospholipid gels as drug delivery systems for small molecular weight drugs, peptides and proteins: State of the art review. *International journal of pharmaceutics* **2019**; 557, 1-8.
99. Bender, J., Michaelis, W., Schubert, R. Morphological and thermal properties of vesicular phospholipid gels studied by DSC, rheometry and electron microscopy. *Journal of thermal analysis and calorimetry* **2002**; 68(2), 603-612.
100. Engelhardt, K. H., Pinnapireddy, S. R., Baghdan, E., Jedelská, J., Bakowsky, U. Transfection studies with colloidal systems containing highly purified bipolar tetraether lipids from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Archaea* **2017**.
101. Jacquemet, A., Barbeau, J., Lemiègre, L., Benvegna, T. Archaeal tetraether bipolar lipids: structures, functions and applications. *Biochimie* **2009**; 91(6), 711-717.
102. De Rosa, M., Gambacorta, A. The lipids of archaebacteria. *Progress in lipid research* **1988**; 27(3), 153-175.
103. Benvegna, T., Brard, M., Plusquellec, D. Archaeabacteria bipolar lipid analogues: structure, synthesis and lyotropic properties. *Current opinion in colloid & interface science* **2004**; 8(6), 469-479.
104. Nuraje, N., Bai, H., Su, K. Bolaamphiphilic molecules: Assembly and applications. *Progress in polymer science* **2013**; 38(2), 302-343.
105. Meister, A., Bastrop, M., Koschoreck, S., Garamus, V. M., Sinemus, T., Hempel, G., Drescher, S., Dobner, B., Richtering, W., Huber, K., Blume, A. Structure–property relationship in stimulus-responsive bolaamphiphile hydrogels. *Langmuir* **2007**; 23(14), 7715-7723.
106. Blume, A., Drescher, S., Graf, G., Köhler, K., Meister, A. Self-assembly of different single-chain bolaphospholipids and their miscibility with phospholipids or classical amphiphiles. *Advances in colloid and interface science* **2014**; 208, 264-278.
107. Meister, A., Köhler, K., Drescher, S., Dobner, B., Karlsson, G., Edwards, K., Hause, G., Blume, A. Mixing behaviour of a symmetrical single-chain bolaamphiphile with phospholipids. *Soft Matter* **2007**; 3(8), 1025-1031.

108. Köhler, K., Förster, G., Hauser, A., Dobner, B., Heiser, U. F., Ziethe, F., Richter, W., Steiniger, F., Drechsler, M., Stettin, H., Blume, A. Self-Assembly in a Bipolar Phosphocholine–Water System: The Formation of Nanofibers and Hydrogels. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**; 43(2), 245-247.
109. Köhler, K., Meister, A., Förster, G., Dobner, B., Drescher, S., Ziethe, F., Richter, W., Steiniger, F., Drechsler, M., Hause, G., Blume, A. Conformational and thermal behavior of a pH-sensitive bolaform hydrogelator. *Soft Matter* **2006**; 2(1), 77-86.
110. Köhler, K., Förster, G., Hauser, A., Dobner, B., Heiser, U. F., Ziethe, F., Richter, W., Steiniger, F., Drechsler, M., Stettin, H., Blume, A. Temperature-dependent behavior of a symmetric long-chain bolaamphiphile with phosphocholine headgroups in water: From hydrogel to nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2004**; 126(51), 16804-16813.
111. Graf, G., Drescher, S., Meister, A., Dobner, B., Blume, A. Self-assembled bolaamphiphile fibers have intermediate properties between crystalline nanofibers and wormlike micelles: Formation of viscoelastic hydrogels switchable by changes in pH and salinity. *The Journal of Physical Chemistry B* **2011**; 115(35), 10478-10487.
112. Szoka Jr, F., Papahadjopoulos, D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annual review of biophysics and bioengineering* **1980**; 9(1), 467-508.
113. Meister, A., Drescher, S., Garamus, V. M., Karlsson, G., Graf, G., Dobner, B., Blume, A. Temperature-dependent self-assembly and mixing behavior of symmetrical single-chain bolaamphiphiles. *Langmuir* **2008**; 24(12), 6238-6246.
114. El Fawal, G. F., Abu-Serie, M. M., Hassan, M. A., Elnouby, M. S. Hydroxyethyl cellulose hydrogel for wound dressing: Fabrication, characterization and in vitro evaluation. *International journal of biological macromolecules* **2018**; 111, 649-659.
115. Apothekerverbände, B. D. Vaginalgel pH 5 (NRF 25.3). Deutscher Arzneimittel-Codex (DAC)/Neues Rezeptur Formularium (NRF) **2009**.
116. Higuchi, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of pharmaceutical sciences* **1963**; 52(12), 1145-1149.

117. Korsmeyer, R. W., Peppas, N. A. Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water soluble drugs. *Journal of membrane Science* **1981**; 9(3), 211-227.
118. Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., Peppas, N. A. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International journal of pharmaceutics* **1983**; 15(1), 25-35.
119. Balouiri, M., Sadiki, M., Ibensouda, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis* **2016**; 6(2), 71-79.
120. Arikan, S., Paetznick, V., Rex, J. H. Comparative evaluation of disk diffusion with microdilution assay in susceptibility testing of caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* **2002**; 46(9), 3084-3087.
121. Vargas, A., Zeisser-Labouèbe, M., Lange, N., Gurny, R., Delie, F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews* **2007**; 59(11), 1162-1176.
122. Doke, S. K., Dhawale, S. C. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2015**; 23(3), 223-229.
123. <https://www.tierversuche-verstehen.de/zahl-der-versuchstiere-bleibt-2018-konstant> (20.09.2020)
124. Nowak-Sliwinska, P., Segura, T., Iruela-Arispe, M. L. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis* **2014**; 17(4), 779-804.
125. Valdes, T. I., Kreutzer, D., Moussy, F. The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* **2002**; 62(2), 273-282.
126. Luepke, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and Chemical Toxicology* **1985**; 23(2), 287-291.

127. Spielmann, H., Kalweit, S., Liebsch, M., Wirnsberger, T., Gerner, I., Bertram-Neis, E., Krauser, K., Kreiling, R., Miltenburger, H. G., Pape, W., Steiling, W. Validation study of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany: cytotoxicity testing and HET-CAM test with 136 industrial chemicals. *Toxicology in Vitro* **1993**; 7(4), 505-510.
128. Palmeira-de-Oliveira, R., Machado, R. M., Martinez-de-Oliveira, J., Palmeira-de-Oliveira, A. Testing vaginal irritation with the hen's egg test-chorioallantoic membrane assay. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation* **2018**; 35(4), 495-503.
129. Bundesgesundheitsamt; Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET). Arbeitsanleitung HET-CAM für die Makrovalidierung, Bundesministerium für Forschung und Technologie (BMFT): *Forschungsvorhaben „Evaluierung von Ersatzmethoden für den Draize-Test am Kaninchenauge“*. BGA **1990**, Berlin.
130. Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Presta, M. The gelatin sponge–chorioallantoic membrane assay. *Nature protocols* **2006**; 1(1), 85-91.
131. Hanford, M. J., Peebles, T. L. Archaeal tetraether lipids. *Applied biochemistry and biotechnology* **2002**; 97(1), 45-62.
132. Manirakiza, P., Covaci, A., Schepens, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. *Journal of food composition and analysis* **2001**; 14(1), 93-100.
133. Engelhardt, K. Herstellung und Charakterisierung tetraetherlipidhaltiger Lipoplexe und Lipopolyplexe als neuartige Vehikel für die orale Gentherapie (Doctoral dissertation, Philipps-Universität Marburg **2017**).
134. Estroff, L. A., Hamilton, A. D. Water gelation by small organic molecules. *Chemical Reviews* **2004**; 104(3), 1201-1218.
135. Jin, H., Nishiyama, Y., Wada, M., Kuga, S. Nanofibrillar cellulose aerogels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2004**; 240(1-3), 63-67.
136. Joubert, L. M. Visualization of hydrogels with variable-pressure SEM. *Microscopy and Microanalysis* **2009**; 15(S2), 1308-1309.

137. Luo, P., Liu, L., Xu, W., Fan, L., Nie, M. Preparation and characterization of aminated hyaluronic acid/oxidized hydroxyethyl cellulose hydrogel. *Carbohydrate polymers* **2018**; 199, 170-177.
138. Neuhofer, C. Development of lipid based depot formulations using interferon-beta-1b as a model protein (Doctoral dissertation, lmu **2015**).
139. Lasic, D. D. The mechanism of vesicle formation. *Biochemical Journal* **1988**; 256(1), 1-11.
140. Johnsson, M., Edwards, K. Liposomes, disks, and spherical micelles: aggregate structure in mixtures of gel phase phosphatidylcholines and poly (ethylene glycol)-phospholipids. *Biophysical Journal* **2003**; 85(6), 3839-3847.
141. Fox, C. B., Mulligan, S. K., Sung, J., Dowling, Q. M., Fung, H. M., Vedvick, T. S., Coler, R. N. Cryogenic transmission electron microscopy of recombinant tuberculosis vaccine antigen with anionic liposomes reveals formation of flattened liposomes. *International Journal of Nanomedicine* **2014**; 9, 1367.
142. Meister, A., Blume, A. (Cryo) transmission electron microscopy of phospholipid model membranes interacting with amphiphilic and polyphilic molecules. *Polymers* **2017**; 9(10), 521.
143. Brüßler, J. Entwicklung und Charakterisierung nanoskaliger Lipidformulierungen als Ultraschallkontrastmittel zur sonothrombolytischen Therapie (Doctoral dissertation, Philipps-Universität Marburg **2012**).
144. Varaprasad, K., Raghavendra, G. M., Jayaramudu, T., Yallapu, M. M., Sadiku, R. A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications. *Materials Science and Engineering: C* **2017**; 79, 958-971.
145. Blume, A., Drescher, S., Meister, A., Graf, G., & Dobner, B. Tuning the aggregation behaviour of single-chain bolaphospholipids in aqueous suspension: from nanoparticles to nanofibres to lamellar phases. *Faraday discussions* **2013**; 161, 193-213.
146. Chanmugam, A., Langemo, D., Thomason, K., Haan, J., Altenburger, E. A., Tippet, A., Henderson, L., Zortman, T. A. Relative temperature maximum in wound infection and inflammation as compared with a control subject using long-wave infrared thermography. *Advances in skin & Wound care* **2017**; 30(9), 406-414.

147. Kaiser, N., Kimpfler, A., Massing, U., Burger, A. M., Fiebig, H. H., Brandl, M., Schubert, R. 5-Fluorouracil in vesicular phospholipid gels for anticancer treatment: entrapment and release properties. *International journal of pharmaceutics* **2003**; 256(1-2), 123-131.
148. Lee, P. I. Kinetics of drug release from hydrogel matrices. *Journal of Controlled Release* **1985**; 2, 277-288.
149. Tardi, C., Brandl, M., Schubert, R. Erosion and controlled release properties of semisolid vesicular phospholipid dispersions. *Journal of controlled release* **1988**; 55(2-3), 261-270.
150. Möckel, J. E., Lippold, B. C. Zero-order drug release from hydrocolloid matrices. *Pharmaceutical research* **1993**; 10(7), 1066-1070.
151. Güres, S. Experimentelle Untersuchungen und mathematisch-theoretische Vorhersagen des Freisetungsverhaltens aus extrudierten Fettmatrices (Doctoral dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2012**).
152. Chang, E. L. Unusual thermal stability of liposomes made from bipolar tetraether lipids. *Biochemical and biophysical research communications* **1994**; 202(2), 673-679.
153. Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W. S., Ichikawa, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* **2000**; 50(1), 27-46.
154. Bruschi, M. L. Strategies to modify the drug release from pharmaceutical systems. Woodhead Publishing **2015**
155. Meister, A., Drescher, S., Mey, I., Wahab, M., Graf, G., Garamus, V. M., Hause, G., Mögel, H.-J., Janshoff, A., Dobner, B., Blume, A. Helical nanofibers of self-assembled bipolar phospholipids as template for gold nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B* **2008**; 112(15), 4506-4511.
156. Kordts, M., Kerth, A., Drescher, S., Ott, M., Blume, A. The cmc-value of a bolalipid with two phosphocholine headgroups and a C24 alkyl chain: Unusual binding properties of fluorescence probes to bolalipid aggregates. *Journal of colloid and interface science* **2017**; 501, 294-303.



157. Moran, G. J., Krishnadasan, A., Gorwitz, R. J., Fosheim, G. E., McDougal, L. K., Carey, R. B., Talan, D. A. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *New England Journal of Medicine* **2006**; 355(7), 666-674.
158. Wainwright, M., Phoenix, D. A., Laycock, S. L., Wareing, D. R. A., Wright, P. A. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters* **1998**; 160(2), 177-181.
159. Hájek, V., Meugnier, H., Bes, M., Brun, Y., Fiedler, F., Chmela, Z., Lasne, Y., Fleurette, J., Freney, J. *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* subsp. nov., isolated from bovine nostrils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **1996**; 46(3), 792-796.
160. Sahu, K., Bansal, H., Mukherjee, C., Sharma, M., Gupta, P. K. Atomic force microscopic study on morphological alterations induced by photodynamic action of Toluidine Blue O in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of photochemistry and Photobiology B: Biology* **2009**; 96(1), 9-16.
161. Drulis-Kawa, Z., Dorotkiewicz-Jach, A. Liposomes as delivery systems for antibiotics. *International journal of pharmaceutics* **2010**; 387(1-2), 187-198.
162. Bierer, D. E., Gerber, R. E., Jolad, S. D., Ubillas, R. P., Randle, J., Nauka, E., Latour, J., Dener, J. M., Fort, D. M. Isolation, structure elucidation, and synthesis of irlbacholine, 1, 22-Bis [[[2-(trimethylammonium) ethoxy] phosphinyl] oxy] docosane: A novel antifungal plant metabolite from *Irlbachia alata* and *Anthocleista djalonensis*. *The Journal of Organic Chemistry* **1995**; 60(21), 7022-7026.
163. Lu, Q., Ubillas, R. P., Zhou, Y., Dubenko, L. G., Dener, J. M., Litvak, J., Phuan, P.-W., Flores, M., Ye, Z., Gerber, E., Truong, T. Synthetic analogues of irlbacholine: A novel antifungal plant metabolite isolated from *Irlbachia alata*. *Journal of natural products* **1999**; 62(6), 824-828.
164. Teichert, M. C., Jones, J. W., Usacheva, M. N., Biel, M. A. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* **2002**; 93(2), 155-160.
165. Deibler, G. E., Holmes, M. S., Campbell, P. L., Gans, J. Use of triton X-100 as a hemolytic agent in the spectrophotometric measurement of blood O<sub>2</sub> saturation. *Journal of Applied Physiology* **1959**; 14(1), 133-136.

166. Krzyzaniak, J. F., Núñez, F. A. A., Raymond, D. M., Yalkowsky, S. H. Lysis of human red blood cells. 4. Comparison of in vitro and in vivo hemolysis data. *Journal of pharmaceutical sciences* **1997**; 86(11), 1215-1217.
167. Amin, K., Dannenfelser, R. M. In vitro hemolysis: guidance for the pharmaceutical scientist. *Journal of pharmaceutical sciences* **2006**; 95(6), 1173-1176.
168. Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Roncali, L., Burri, P. H., Djonov, V. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists* **2001**; 264(4), 317-324.
169. International Organization for Standardization. Biological evaluation of medical devices—Part 10: Tests for irritation and skin sensitization (ISO 10993-10: **2010**).
170. Rupprecht, S. Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomson P. Titanium in medicine: materials science, surface science, engineering, biological responses and medical applications. *Mund-, Kiefer-und Gesichtschirurgie* **2002**; 6(3), 203-203.
171. Debefve, E., Pegaz, B., Ballini, J. P., Konan, Y. N., Van den Bergh, H. Combination therapy using aspirin-enhanced photodynamic selective drug delivery. *Vascular pharmacology* **2007**; 46(3), 171-180.
172. Plenagl, N. Liposomale Formulierungen von Hypericin zur Anwendung in der photodynamischen Therapie (Doctoral dissertation, Philipps-Universität Marburg **2019**).

## 12. Anhang

### 12.1. Abkürzungsverzeichnis

aPDT	antimikrobielle photodynamische Therapie
CAM	Chorioallantois-Membran
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DEL	Dietherlipide
DSPC	1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin
EDD	embryonaler Entwicklungstag (engl. „embryo development day“)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GDGT	Glycerol-Dialkyl-Glycerol-Tetraether
GDNT	Glycerol-Dialkyl-Nonitol-Tetraether
GLE	Gesamtlipidextrakt
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HEC	Hydroxyethylcellulose
HET-CAM	engl. “henn’s egg test on the chorioallantoic membrane”
IS	Reizwert (engl. “Irritation Score”)
KBE	koloniebildende Einheiten
LED	Leuchtdiode (engl. “light-emitting diode”)
Me <sub>2</sub> PE	Dimethylphosphoethanolamin
Me <sub>2</sub> PE-C32-Me <sub>2</sub> PE	Dotriacontane-1,1’-Diylbis[2-(Dimethylammino)ethyl Phosphat]
MeOH	Methanol

MHB	Müller-Hinton-Bouillon
MO	Molekülorbital
NaCl	Natriumchlorid
NK	Nachtkultur
OD	optische Dichte
PACT	engl. "photodynamic antimicrobial chemotherapy"
PBS	Phosphatpuffer
PC	Phosphocholin
PC-C32-PC	Dotriacontane-1,1'-Diylbis[2-(Trimethylammino)ethyl Phosphate]
PDI	engl. "photodynamic inactivation"
PDT	Photodynamische Therapie
PLFE	polare Lipidfraktion E
PS	Photosensitizer
REM	Rasterelektronenmikroskopie
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. „reactive oxygen species“)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
<i>spp.</i>	species plurales
TEL	Tetraetherlipid
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TK	Tageskultur
VPGs	vesikuläre Phospholipid Gele (engl. "vesicular phospholipid gels")

## 12.2. Material und Geräte

Bezeichnung	Bezugsquelle
96-Well Platte	Brand GmbH & Co. KG., Wertheim, Deutschland
Analysesoftware, Motic Image Plus 2.0	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland
Analysenwaage, Sartorius Secure	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav, Truttnauer 3850 ELC	Truttnauer GmbH, Linden, Deutschland
Biomasse <i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Surface & Interface Technologies, Rosenhof GmbH, Heiligenstadt, Deutschland
Brutschrank	Heraeus GmbH & Co. KG., Hanau, Deutschland
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Columbia Agar	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Cryo-Transmissionselektronen- mikroskop, Philips-CM120	Philips GmbH, Hamburg, Deutschland
DSPC	TransMIT GmbH, TransMIT-Projekt- bereich für kolloidale Arzneimittel- formulierungen, Gießen, Deutschland
EDTA	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
EggPunch	Schuett-Biotec GmbH, Göttingen, Deutschland
Einmalpipettenspitzen; 10 µL, 200 µL, 1000 µL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Pipette 1-10 µL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Eppendorf Pipette 20-200 µL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Pipette 100-1000 µL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<i>Escherichia coli</i> (DH5α)	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
Ethanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Filtermembran	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Franz-Diffusions-Zellen	Gauer Glas, Püttlingen, Deutschland
Gefriertrockner, ALPHA 1-4 LSC	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Glasrundkolben 5/500/1000 mL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Hatching incubator, Ehret KMB 6	Dipl. Ing. W. Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland
HEC 300	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hühnereier, befruchtet	Brormann GmbH, Rheda-Wiedenbrück, Deutschland
Inkubationsschüttler, IKA KS 4000	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Inkubator, NU-5840E Direct heat inVitroCell CO <sub>2</sub> -Incubator	Nu Aire, Plymouth, USA
Insulinspritze	B Braun AG, Melsungen, Deutschland
Kupfergitter	Quantifoil® S7/2 Cu 400 mesh, holey carbon film grids, Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena, Deutschland
LED Leuchte	Lumundus GmbH, Eisenach, Deutschland

MALDI Biotyper	Bruker Corporation, Billerica, USA
Me <sub>2</sub> PE-C32-Me <sub>2</sub> PE	MLU Halle-Wittenberg, Halle, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methylenblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Micro Tube 1,5 mL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikroskopkamera, Moticam 5 CMOS	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Müller-Hinton Agarplatten	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Müller-Hinton-Bouillon	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
NaCl 0,9 %	B Braun AG, Melsungen, Deutschland
PC-C32-PC	MLU Halle-Wittenberg, Halle, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop	Hitachi-High Technologies Europe GmbH, Krefeld, Deutschland
Rotationsverdampfer, Heidolph Laboroto 4001	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Rotationsviskosimeter, Haake™ Rotovisko 1	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Rückflusskühler	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EDEKA, Marburg, Deutschland

SDS	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Silikonöl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sputter Coater, Edwards S150	Edwards High Vacuum, Crawley, England
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> (DSM 18669)	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
Stereomikroskop, Stemi 2000-C	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Titankegel (Durchmesser 20 mm, Winkel 1°)	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Transmissionselektronenmikroskop, Philips-CM120	Philips GmbH, Hamburg, Deutschland
Triton™ X-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ultraschallbad, Sonorex	Bandelin electronic GmbH & Co. KG., Berlin, Deutschland
UV Mini 1240	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
UV Vis Spektrometer, Multiscan™ GO	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Vakuumpumpe mit Sauer	Laboport® N 86 KT.18, KNF DAC GmbH, Hamburg, Deutschland
Vakuumpumpe (Rotationsverdampfer)	SC 920 G, KNF DAC GmbH, Hamburg, Deutschland
Werkbank, steril ScanLaf Mars	LaboGene Aps, Lyngby, Dänemark
Zentrifuge, CT15RE	Eppendorf Himac Technologies Co., Hitachinaka, Japan



### 12.3. Publikationsliste

#### Publikationen

- **Nathalie Goergen**, Matthias Wojcik, Simon Drescher, Shashank R. Pinnapireddy, Jana Brüßler, Udo Bakowsky, Jarmila Jedelská. The Use of Artificial Gel Forming Bolalipids as Novel Formulations in Antimicrobial and Antifungal Therapy. *Pharmaceutics* **2019**; 11(7), 307.
- Nikola Plenagl, Lili Duse, Benjamin S. Seitz, **Nathalie Goergen**, Shashank R. Pinnapireddy, Jarmila Jedelská, Jana Brüßler, Udo Bakowsky. Photodynamic therapy–hypericin tetraether liposome conjugates and their antitumor and antiangiogenic activity. *Drug delivery* **2019**; 26(1), 23-33.
- Imran Tariq, Shashank R. Pinnapireddy, Lili Duse, Muhammad Y. Ali, Sajid Ali, Muhammad U. Amin, **Nathalie Goergen**, Jarmila Jedelská, Jens Schäfer, Udo Bakowsky. Lipodendriplexes: A promising nanocarrier for enhanced gene delivery with minimal cytotoxicity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2019**; 135, 72-82.
- Julia Giselbrecht, Sophie Wiedemann, Shashank R. Pinnapireddy, **Nathalie Goergen**, Harald Loppnow, Daniel Sedding, Frank Erdmann, Udo Bakowsky, Gerd Hause, Marlene Lúcio, Andreas Langner, Christian Wölk. Nucleic acid carrier composed of a branched fatty acid lysine conjugate—Interaction studies with blood components. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2019**; 184, 110547.
- Catharina Husteden, Falko Doberenz, **Nathalie Goergen**, Shashank R. Pinnapireddy, Christopher Janich, Andreas Langner, Frank Syrowatka, Alexandros Pepanas, Frank Erdmann, Jarmila Jedelská, Udo Bakowsky, Thomas Groth, Christian Wölk. Contact-Triggered Lipofection from Multilayer Films Designed as Surfaces for in Situ Transfection Strategies in Tissue Engineering. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2020**; 12(8), 8963-8977.
- Sajid Ali, Muhammad U. Amin, Muhammad Y. Ali, Imran Tariq, Shashank R. Pinnapireddy, Lili Duse, **Nathalie Goergen**, Christian Wölk, Gerd Hause, Jarmila Jedelská, Jens Schäfer, Udo Bakowsky. Wavelength dependent photocytotoxicity to ovarian carcinoma cells using temoporfin loaded tetraether liposomes as efficient drug delivery system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2020**.

- Mohamad Alawak, Alice Abu Dayyih, Gihan Mahmoud, Imran Tariq, Lili Duse, **Nathalie Goergen**, Konrad Engelhardt, Shashank Reddy Pinnapireddy, Jarmila Jedelská, Muhannad Awak, Alexander M. König, Jana Brüßler, Jörg W. Bartsch, Udo Bakowsky. ADAM 8 as a Novel Target for Doxorubicin Delivery to TNBC Cells using Magnetic Thermosensitive Liposomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2020**.

## Vorträge

- **Nathalie Goergen**, Lili Duse, Jarmila Jedelská, Udo Bakowsky. Photodynamic effect of indocyanine green-loaded liposomes in vivo CRS German Local Chapter, Marburg, März 2-3, **2017**
- **Nathalie Goergen**, Jarmila Jedelská, Jana Brüßler, Simon Drescher, Udo Bakowsky. The CAM assay: testing new lipid formulations in vivo 25th Mountain-Sea-Workshop on Liposomes, Oberjoch, März 6-10, **2017**

## Posterpräsentationen

- Natalie Geisel, Pascal Stahr, **Nathalie Goergen**, Cornelia M. Keck. *Hesperetin nanocrystals – influence of vehicle on TEWL and skin hydration*. CRS German Local Chapter Saarbrücken, März 7-8, **2016**
- **Nathalie Goergen**, Steffen H. Hartmann, Pascal Stahr, Cornelia M. Keck, Jarmila Jedelská, Udo Bakowsky. *HET-CAM test for nanocosmeceuticals*. DPhG – Annual meeting Saarbrücken, September 26-29, **2017**
- **Nathalie Goergen**, Jarmila Jedelská, Jana Brüßler, Simon Drescher, Udo Bakowsky. *Synthetic bolaform amphiphiles as new drug delivery systems*. CRS German Local Chapter, Halle an der Saale, März 1-2, **2018**
- Waala Lutfi, Elias Baghdan, **Nathalie Goergen**, Jarmila Jedelská, Jens Schäfer, Udo Bakowsky. *Henna: the gift of nature against cancer*. CRS German Local Chapter, Halle an der Saale, März 1-2, **2018**

- **Nathalie Goergen**, Eduard Preis, Jarmila Jedelská, Jana Brüßler, Simon Drescher, Udo Bakowsky. *In situ forming hydrogels made of artificial bolaform amphiphiles as new drug delivery systems*. Théodore von Káman – Discusson Conference on Materials for Life, Bergisch Gladbach, August 15-18, **2018**
- **Nathalie Goergen**, Nikola Plenagl, Jarmila Jedelská, Jana Brüßler, Udo Bakowsky. *Antimicrobial photodynamic therapy in modified chicken embryo model*. CRS German Local Chapter Leipzig, März 7-8, **2019**

## **12.4. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Udo Bakowsky, für die Möglichkeit an diesem interessanten Thema zu arbeiten, sowie für die wissenschaftliche Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft während der gesamten Bearbeitungsphase.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Frank Runkel für die Erstellung des Zweitgutachtens und die Prüfung der Dissertation bedanken.

Frau Prof. Dr. Maike Petersen danke ich für die Prüfung meiner Dissertation als Nebenfachprüfer sowie für die Leitung der Prüfungskommission.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Reuter für die Prüfung der Dissertation als Nebenfachprüfer bedanken.

Bei Frau Dr. Jana Brüßler und Frau Dr. Jarmila Jedelská möchte ich mich herzlich für die fachliche Betreuung, die fortwährenden Unterstützung mit guten Ratschlägen, für die vielen motivierenden Gespräche und nicht zuletzt für die schöne gemeinsame Zeit in den letzten Jahren bedanken.

Danken möchte ich zudem PD Dr. Simon Drescher für die Bereitstellung der synthetischen Bolaamphiphile, die anregenden fachlichen Gespräche und für die außerordentlich gute Zusammenarbeit während der gesamten Bearbeitungsphase.

Herrn Dr. Gerd Hause und Frau Dr. Anette Meister an der MLU Halle-Wittenberg danke ich für die Aufnahmen der cryo-TEM Bilder.

Meinem Kollegen Dr. Matthias Wojcik danke ich für die REM-Aufnahmen.

Außerdem danke ich Herrn Eduard Preis für die Einführung in die bestehenden SOPs der Mikrobiologie und die hilfreichen Ratschläge in der ersten Phase des Projektes.

Herzlich bedanken möchte ich mich zudem bei meinen Kollegen und Ehemaligen, Alice Abu Dayyih, Michael Agel, Mohamad Alawak, Muhammad Ali, Sajid Ali, Muhammad Amin, Elias Baghdan, Jürgen Bürding, Henriette Dietrich, Dr. Lili Duse, Dr. Konrad Engelhard, Bernd Gutberlet, Sascha Hubing, Jennifer Lehmann, Walaa Lutfi, Susanne Lüttebrand, Julia Michaelis, Eva Mohr, Chantal Ostrowski,

Dr. Shashank Reddy Pinnapireddy, Michael Raschpichler, Dr. Jens Schäfer, Jan Schulze, Dr. Eric Sasko, Hirva Shah, Tan Shi, Benjamin Sebastian Seitz, Boris Strehlow, Dr. Imran Tariq und Dr. Hendrik Vögeling des Arbeitskreises Bakowsky sowie Frau Prof. Dr. Cornelia M. Keck und den (ehemaligen) Mitgliedern ihrer Arbeitsgruppe Ralph Eckert, Steffen Hartmann, Olga Pelikh, Dr. Florian Stumpf, David Specht und Sabrina Wiemann für die Hilfe, Anregungen, produktiven Gespräche und nicht zuletzt das gute Arbeitsklima und die gemeinsam erlebte Zeit.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Julia Janina Schürer und Pascal Stahr, die mich stets unterstützt und motiviert haben, sowie für die schönen Stunden während und nach der Arbeit.

Insbesondere möchte ich mich an dieser Stelle auch meiner Familie und meinem Lebensgefährten für ihre Geduld, Aufmunterung sowie beständige Unterstützung während der letzten Jahre und für ihre liebevolle Nachsicht in den letzten Monaten bedanken.

## 12.5. Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**„Wirkstoffträgersysteme basierend auf  
bolaamphiphilen Lipiden zur topischen photodynamischen Therapie  
von Infektionen“**

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quelle bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Wuppertal, den 09.10.2020

.....

(Unterschrift mit Vor- und Zunamen)